Übungen zur Ökologie SS2006
Kursteil Pflanzenökologie II

Der Kursteil Pflanzenökologie II besteht aus den zwei Arbeitsbereichen

- ***Thema 1: Wasserhaushalt der Pflanze***
- ***Thema 2: Gaswechsel des Blattes***

Die theoretischen Grundlagen beider Themen sind im Text durch einen blauen Hintergrund, die Versuchstheorie und detaillierte Bedienungsanleitungen für die Geräte durch einen roten Hintergrund gekennzeichnet. Die Aufgabenstellung und die Versuchsdurchführung wurde nicht farbig hinterlegt.
Aufgrund der zeitlichen, räumlichen, personal- und geräteweisen Beschränkungen können nicht alle Kursteilnehmer auch Versuche zu jedem der drei Themenbereiche ausführen. Die Kursteilnehmer werden deshalb zu Beginn des Praktikums auf die folgenden 6 Gruppen mit jeweils 3-4 Teilnehmer aufgeteilt:

THEMA 1: WASSERHAUSHALT DER PFLANZEN

Gruppe 1: Wasserpotentialbestimmung mit verschiedenen Methoden und von verschiedenen Geweben

a) Blattwasserpotentialbestimmung nach Scholander
b) Blattwasserpotentialbestimmung mit dem Blattpsychrometer
c) Einfache Methode zur Bestimmung des Wasserpotentials in Kartoffelknollen.

Gruppe 2: Einfache Methoden zur Bestimmung des Osmotischen Potentials

a) Demonstrationsversuch zur Verdeutlichung des Messprinzips (wird nicht im Praktikum durchgeführt): Messung des osmotischen Werts von Presssäften mit der Kryoskopie
b) Bestimmung des Osmotischen Potentials mit dem Kryo-Osmometer
c) Vergleich mit Versuch a) Bestimmung des osmotischen Potentials mit dem Psychrometer

Gruppe 3: Einfache Methoden zur Bestimmung des Matrixpotentials, des Wurzeldrucks und des Transpirationssogs

a) Einfache Methode zur Bestimmung des Matrixpotentials von quellenden Samen.
b) Demonstration des Wurzeldrucks anhand „Bluten“ verletzter Pflanzen
c) Transpirationssog

THEMA 2: GASWECHSEL DES BLATTES

Gruppe 4: CO_2-Gaswechsel von C_3- und C_4 -Arten

a) Porometrische Gaswechselmessungen mit dem Li-COR 6200
b) Vergleich der Blattanatomie von C_3- und C_4 -Arten

Gruppe 5: Transpiration der Pflanzen

a) Porometrische Bestimmung der Transpiration mit dem LI-1600
b) Morphologie und Physiologie der Stomata
c) Messung des Randfeldeffekts

Gruppe 6: Membranintegrität und Chlorophyllmessung

a) Leitfähigkeitstest zur Erfassung der Membranintegrität
b) Chlorophyllfluoreszenzmessung mit dem SPAD

c) Extraktion von Blattpigmenten für die Versuche d und e)
d) Fluoreszenz von Chlorophyll in Lösung
e) Dünnschichtchromatographische Trennung der Chloroplastenfarbstoffe

Eine Kopiervorlage für das Skript vom Kursteil „Pflanzenökologie II“ kann im Sekretariat des Instituts für Pflanzenökologie abgeholt werden oder als pdf-Datei über das Internet http://www.uni-giessen.de/fb15/pflanzenoeko/materialien.html herunter geladen werden. Das Skript enthält die thematischen Grundlagen der Arbeitsbereiche und ausführliche Beschreibungen der Gruppen und der einzelnen Versuche. Die Gruppenverteilung erfolgt am Praktikumstag. Es ist beabsichtigt die studentischen Interessen dabei zu berücksichtigen.

Am Ende des Praktikumstages werden die Ergebnisse der Versuche von den Kursteilnehmern erläutert. Die Darstellung der Versuche soll im thematischen Zusammenhang mit dem jeweiligen Arbeitsbereich erfolgen. Für die Darstellung stehen eine Wandtafel und ein Overheadprojektor zur Verfügung

Thema 1 : Wasserhaushalt der Pflanze (Theoretische Grundlage)

Bearbeitet von PD Dr. Hans-Werner Koyro

1. Themenbereiche des Kursteils "Wasserhaushalt der Pflanze"

Wasser ist als Lösungsmittel für alle Organismen ein unabdingbarer Inhaltsstoff Höhere Pflanzen terrestrischer Ökosysteme nehmen Wasser fast ausschließlich über den Boden auf Eine Abnahme des Wasserpotentials im Boden (z.B. durch Trockenstress oder NaCl-Salinität) führt zu einer Behinderung der Wasseraufnahme in die Pflanze. Bei normalen mitteleuropäischen Klimabedingungen (20 °C, 60% rF) ist der Wasser- potentialgradient zwischen der Blattoberfläche und der Atmosphäre sehr groß. Der Gasaustausch über die Spaltöffnungen ($C0_2$ gegen H_20) stellt in der Pflanze eine Achillesverse bei Trockenstress und Salinität dar. Eine verminderte Transpiration kann die Auswirkungen vermindern.

2. Theoretische Grundlagen

Der theoretische Hintergrund zu den im Kurs durchgeführten Untersuchungen wird in der Vorlesung „Einführung in die Pflanzenökologie" vermittelt, die jeweils im Wintersemester gehalten wird. Im Folgenden werden dennoch die wichtigsten Grundkenntnisse und Beziehungen dargestellt. Dieser kurze Abriss kann jedoch den Besuch dieser Vorlesung und das Studium der angegebenen Literatur nicht ersetzen !

Als Literatur für diesen speziellen Kursteil wird empfohlen:

Larcher, Walter (1994): Ökophysiologie der Pflanzen, 5. Aufl. Ulmer, Stuttgart (UTB Große Reihe).
Daraus die Kap. 4.1 (Grundtypen des Wasserhaushalts), 4.2 (Wasserhaushalt der Zelle) und 4.3 (Wasserhaushalt der Pflanze) als generelles Hintergrundwissen;
zur Vertiefung in die speziellen, im Praktikum am Beispiel behandelten Fragestellungen insbesondere die Kap. 4.2.1 (Wasser in der Zelle), 4.2.2 (Wasserpotential der Zelle), 4.2.3 (Wasserzustand der Zelle als Fließgleichgewicht), 4.3.3 (Wasserabgabe) und 4.3.4 (Wasserbilanz der Pflanze).

Steubing, Lore & Fangmeier, Andreas (1992): Pflanzenökologisches. Praktikum. Ulmer, Stuttgart.(UTB Große Reihe).
Als Vorbereitung für den praktischen Teil werden die Versuche 113 (Bestimmung des Wasserpotentials mit der Scholander-Bombe) und 120 (Porometrische Messung von Transpiration, stomatärem Leitwert und Diffusionswiderstand) empfohlen. Neben Funktionsweise und Handhabung der Geräte werden dort auch jeweils kurz die theoretischen Grundlagen in leicht verständlicher Form abgehandelt. Im Anhang finden sich die benötigten Angaben zur Umrechnung physikalischer Einheiten.

Von Willert, Dieter J., Matyssek, Rainer & Herppich, Werner (1995): Experimentelle Pflanzen-ökologie. Thieme, Stuttgart.

In diesem Werk werden theoretische Grundlagen, methodische Möglichkeiten und Messtechniken für die im Kurs durchgeführten Messungen sehr detailliert und mit umfangreichen mathematischen Formeln dargestellt.

Campbell, N.A. (1997): Biologie. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
Kapitel 32 (Transport in Pflanzen) für die Einführung in die Theorie des Wasserhaushalts

3. Stofftransport in die Pflanze

Der Stofftransport in Pflanzen erfolgt auf drei Ebenen:

1) Die Aufnahme und Abgabe von Wasser und Mineralstoffen durch Zellen, z.B. die Aufnahme von Wasser aus dem Boden durch Wurzelzellen.

2) Der Transport von Substanzen über kurze Entfernungen.(Lateraltransport) von Zelle zu Zelle wie die Translokation von Wasser und Mineralstoffen radial durch den Wurzelquerschnitt.

3) Der Ferntransport von Xylem- oder Phloemsaft über große Distanz durch die ganze Pflanze.

4. Wasserhaushalt der Pflanze

Pflanzen terrestrischer Ökosysteme sind in das Gefälle des Wasserpotentials (s.u.) zwischen Boden und Atmosphäre eingespannt. Aufgrund des stark negativen Wasserpotentials der Luft war die Besiedelung des Landes durch höhere Pflanzen erst möglich, nachdem im Verlauf der Evolution die Entwicklung von Verdunstungsschutz (Cuticula, Spaltöffnungen etc.) stattgefunden hatte. Erst der Schutz vor und die Regulation der Verdunstung (= Evaporation) bewirkten, dass im pflanzlichen Gewebe ein relativ konstanter Wassergehalt zur Verfügung stand.

Die treibende Kraft für die Wasserbewegung ist die Konzentration an freiem, potentiell verfügbarem Wasser. In reinem Wasser ist die Konzentration an freiem Wasser am größten und das **Wasserpotential (φ)** definitionsgemäß gleich 0. Nimmt die Konzentration von freiem Wasser z.B. durch gelöste Stoffe ab, entsteht ein negatives Potential (Zahl mit negativem Vorzeichen), so dass durch **Diffusion** ein Austausch von Wasser und gelösten Stoffen zwischen Lösungen mit unterschiedlichem Wasserpotential stattfindet .(Ficksches Diffusionsgesetz). Wasser fließt generell vom Ort höherer zum Ort niedriger Verfügbarkeit. Das Wasserpotential sagt aus, wie stark eine wässrige Lösung bestrebt ist, Wasser aus der Umgebung aufzunehmen und bezieht sich auf die potentielle Energie, also die Fähigkeit, Arbeit zu leisten, wenn sich Wasser von einer Region mit höherem φ zu einer Region mit niedrigem φ bewegt. Wasserpotentiale sind negative Drücke, die in der Druckeinheit Pa (Pascal, 1 Pa = 1 J m^{-3}) oder MPa (Megapascal) gemessen werden.
Das Wasserpotential einer Lösung hat die folgende Beziehung zu der Konzentration gelöster Substanzen (Ficksches Diffusionsgesetz):

$\varphi = n * R * T$
φ = Wasserpotential [MPa]
n = Konzentration der gelösten Teilchen [kmol l^{-1}]
R = allgemeine Gaskonstante = 8.3144 J mol^{-1} K^{-1}
T = Temperatur [K]

Das Wasserpotential in Böden hängt von der Bodenart und seinem Wassergehalt ab, bei hohem Wassergehalt liegt das Wasserpotential nahe Null, mit zunehmender Austrocknung sinkt es auf Werte unter -5 MPa (zum Vergleich: der Grenzwert des **Permanenten Welkepunktes**, ab dem Pflanzen kein Wasser mehr aus dem Boden aufnehmen können, wird für Ackerböden mit ca. –1,5 MPa angegeben). Pflanzenwurzeln können nur dann Wasser aus dem Boden aufnehmen, wenn ihr Wasserpotential stärker negativ ist als das des Bodens; dasselbe gilt für die Weiterleitung innerhalb der Leitungsbahnen.

5. Wasserzustand der pflanzlichen Zelle und Osmose

Die Nettoaufnahme oder -abgabe von Wasser in einer Zelle erfolgt durch **Osmose** d.h. die **Diffusion** über **semipermeable Membranen**. Dabei findet ein passiver Transport von Wasser durch eine Membran statt. Durch Osmose bewegt sich Wasser von einer **hypotonischen** in Richtung der **hypertonischen** Lösung, d.h. von einem Ort mit einer vergleichsweise höheren Konzentration an ungebundenem Wasser zu einem Ort niedrigerer Konzentration. Auch beeinflusst die Attraktion zwischen Wassermolekülen und der festen Matrix in einer Zelle (z.B. Zellwand oder organische Moleküle wie Proteine) die Verfügbarkeit an ungebundenem Wasser (Wasserverfügbarkeit). Das Matrixpotential begründet das Anschwellen von Substanzen wie Gelatine oder Zelluose in reinem Wasser und ist der Grund für die Quellung der Samenschalen von Gefäßpflanzen. In der Pflanzenzelle beeinflußt (im Unterschied zur tierischen Zelle) zusätzlich die Zellwand die Osmose durch physikalischen Druck (**Turgor**). Die kombinierte Wirkung dieser drei Faktoren wird in dem Ausdruck **Wasserpotential** zusammengefasst:

$\varphi_{Zelle} = \varphi_\pi + \varphi_P + \varphi_\tau$

φ_π = osmotisches Potential des Zellsaftes (negatives Vorzeichen, s.o.)

φ_P = Turgordruck der Zellwände (in der Regel positives Vorzeichen, kann bei Wassermangel aber auch Null oder negativ sein, stellt den Druck dar, den die Zellwände weiterem Einströmen von Wasser entgegensetzen)

φ_τ = Matrixdruck (negatives Vorzeichen, gibt an, wie stark Plasma, Zellwände etc. Wasser an sich binden)

6. Wasserverfügbarkeit in der Atmosphäre

Die „Zugkraft“ die letztlich zum Wassertransport aus dem Boden durch die Pflanze bis in die Luft führt, ist das stark negative Wasserpotential der Luft. Zum Verständnis des weiteren Wegs des Wassers (mit einem Phasenübergang von flüssig im Boden und in der Pflanze zu gasförmig in der Luft) aus der Pflanze in die Atmosphäre muss zunächst geklärt werden, welches Wasserpotential die Luft besitzt.

Ein Teil des Wassers liegt auch bei Temperaturen unter dem Siedepunkt (100 °C) dampfförmig vor. Bei Sättigung der Luft mit Wasserdampf läßt sich der **Sättigungswasserdampfdruck** e_{sat}, der ausschließlich von der Temperatur abhängig ist, nach folgender Näherungsformel berechnen:

e_{sat} [kPa] = 101.325 exp(13.3185 t - 1.976 t^2 - 0.6445 t^3 - 0. 1229 t^4),
wobei t = 1 - (373.15 K - T_{akt}), T_{akt} = momentane Lufttemperatur in °K.

Sättigung der Luft mit Wasserdampf bedeutet Nebel (Auskondensieren von flüssigem Wasser in Tröpfchenform), in der Regel ist die Luft nicht wasserdampfgesättigt. Die **relative Luftfeuchte rF** (in %) gibt an, wie viel % der Wasserdampfsättigung erreicht sind:

rF = e/ e_{sat} * 100 [%],
wobei e der aktuell herrschende Wasserdampfdruck (in kPa) ist.

Wasserdampfdrücke und **absolute Wasserdampfgehalte** in der Luft lassen sich über die Gasgesetze ineinander umrechnen:

e = c_w * R, T,
wobei c_w = Wasserdampfgehalt in der Luft (in mol l^{-1}); zu R, und T s.o.

Als **Sättigungsdefizit der Luft VPD** (von engl. vapor pressure deficit) wird die Differenz im Wasserdampfdruck oder im Wasserdampfgehalt zwischen Sättigung und aktuellem Wasserdampfgehalt bezeichnet. Die Einheit des VPD ist entweder kPa oder mol l^{-1} oder g l^{-1}. Die absolute Feuchte (hier w_L genannt) lässt sich auch als Partialdruck des Wasserdampfs im Verhältnis zum Luftdruck darstellen:

w_L = e / P,
wobei P = Luftdruck und die Dimension von w_L = Pa kPa^{-1}.

Entsprechend lässt sich das VPD auf dieser Bezugsbasis als Differenz zwischen absoluter Feuchte bei dem herrschenden Wasserdampfdruck und dem Sättigungswasserdampfdruck darstellen:

$\Delta w_L = (e_{sat} - e)/P$ (in Pa kPa^{-1}).

Anhand der vorangegangenen Formeln lassen sich Wasserdampfdrücke, Wasserdampfgehalte, relative Feuchten und Sättigungsdefizite berechnen. Mit der relativen Feuchte lässt sich auch das Wasserpotential von Wasserdampf in der Luft berechnen:

$\varphi_{Wasserdampf}$ = R T / V_w * In (rF/100),
wobei V_w = partielles Molvolumen des Wassers (~18 10^{-6} m^3 mol^{-1}).

Berechnungsbeispiel: Luft mit 100 % relativer Feuchte besitzt (logischerweise) bei 20 °C ein Wasserpotential von 0 MPa (da In 1 = 0), Luft mit 75 % rF bereits -39 MPa, mit 50 % rF -93 MPa,

also ein enormes Bestreben, Wasser an sich zu reißen. Diese stark negativen Wasser- potentiale würden ohne Verdunstungsschutz binnen kurzer Zeit zum vollständigen Aus- trocknen der Vegetation führen. Höhere Pflanzen haben Mechanismen entwickelt, um die Wasserdampfabgabe zu regulieren, sie führen also **Transpiration** durch (im Gegensatz zur ungeregelten Wasserdampfabgabe = Verdunstung = Evaporation, wie sie aus Bodenober- flächen, aber auch aus den Thalli z.B. von Flechten erfolgt).

7. Grundlagen des Gaswechsels von Wasserdampf

Treibende Kraft für den Gasaustausch ist der Konzentrationsgradient zwischen Blattinnerem und Atmosphäre. Die Grundlagen für die Berechnung der Wasserdampfkonzentrationen und -drücken und der absoluten Feuchte sind oben aufgeführt worden. Für die Betrachtung des Gaswechsels bietet sich dessen **Analogie** zum Fließen eines **elektrischen Stroms** an, für den das Ohm'sche Gesetz gilt: U = R * I. Für den Gaswechsel entspricht der Konzentrationsgradient in dieser Analogie der Spannung U, die Gaswechselrate dem Strom I und die dem Gaswechsel entgegenstehenden Widerstände dem elektrischen Widerstand R.
Gaswechselwiderstände für den Wasserdampfaustausch zwischen Blatt und Atmosphäre sind der **stomatäre Widerstand** und dazu parallel geschaltet der (sehr hohe) **cuticuläre Widerstand**, dann folgen der **Grenzschichtwiderstand** und schließlich der **atmosphärische Widerstand**. Den Kehrwert dieser Widerstände bezeichnet der **Diffusionsleitwert** (englisch Conductance).

Analog zurn Ohm'schen Gesetz läßt sich die Transpiration (Symbol E) dann wie folgt beschreiben:

$E = (w_{Li} - w_{La}) / r_{ges}$, oder $E = (w_{Li} - w_{La}) * g_{ges}$
wobei w_{Li} und w_{La} die absoluten Feuchten im Blatt bzw. außen sind und r_{ges} bzw. g_{ges} den Gesamtwiderstand bzw. den Gesamtleitwert repräsentieren.

Wird die treibende Kraft für die Transpirationsrate als Differenz der absoluten Feuchten in der entsprechenden Maßeinheit (Pa/kPa) eingesetzt, so ergeben sich als physikalische Einheiten in diesem Modell:

Transpirationsrate E in [mol H_20 m^{-2} s^{-1}] oder in [µg H_20 cm^{-2} s^{-1}], entsprechend
Widerstand r in [m^2 s mol^{-1}] oder in [cm^2 s $µg^{-1}$], bzw.
Leitwert g in [mol m^{-2} s^{-1}] oder in [µg cm^{-2} s^{-1}].

Statt der absoluten Feuchte in Pa/kPa lässt sich auch der Wasserdampfgehalt in [mol m^{-3}] oder in [g m^{-3}] als treibende Kraft ansehen und in die Gleichung einsetzen. Dann ergeben sich andere physikalische Größen für den Widerstand r bzw. den Leitwert g:

Transpirationsrate E in [µg H_20 m^{-2} s^{-1}], entsprechend
Widerstand r in [in m s^{-1}] oder in cm s^{-1}], bzw.
Leitwert g in [s m^{-1}] oder in [s cm^{-1}].

In den letzten Jahren hat sich immer mehr durchgesetzt, mit Leitwerten in der Dimension mol m^{-2} s^{-1} zu rechnen. Diese Dimension hat u.a. den Vorteil, eine einfache Berechnung des internen $C0_2$-Partialdrucks zuzulassen (s.u., Abschnitt 2.4). Unter Einbeziehung der Gasgesetze lassen sich die verschiedenen Dimensionen der Leitwerte ineinander umrechnen, es gilt:

g [mol m^{-2} s^{-1}] = g [cm s^{-1}] * 0.446 * T_o/T * P/P_o,

wobei T_o = 273.15 °K, T = Temperatur in °K, P_o = 101,325 kPa, P = Luftdruck in kPa.

8. Stomata und ihre Regulation

Die einzelnen Diffusionswiderstände sind unterschiedlich groß und von verschiedenen Faktoren abhängig. Der cuticuläre Widerstand hängt von deren Beschaffenheit und Dicke ab; in der Regel übersteigt er die Größe des stomatären Widerstandes um zwei Größenordnungen, so dass Wasserverluste über die Cuticula nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der stomatäre Widerstand kann als einziger von der Pflanze relativ schnell (im Bereich von Minuten) aktiv verändert werden; er spielt daher für die kurzfristige Regulation des Gaswechsels die wichtigste Rolle. Der Grenzflächenwiderstand kommt dadurch zustande, dass jedem Blatt eine laminare Grenzschicht aus wenig bewegter Luft aufliegt, in der keine Turbulenz herrscht und ein Gasaustausch demzufolge nur durch molekulare Diffusion stattfinden kann, die einen langsamen Vorgang darstellt. Die Dicke dieser Grenzschicht hängt u.a. von der Blattmorphologie (Behaarung, Blattgröße etc.) ab und von der Windbewegung. Bei geringer Luftbewegung liegt der Grenzflächenwiderstand im Bereich des stomatären Widerstandes, ist also von bedeutender Größe. Erst bei hohen Windgeschwindigkeiten wird er vernachlässigbar klein. Der atmosphärische Widerstand schließlich wird von den Austauscheigenschaften der Atmosphäre, in erster Linie ihrer Turbulenz, aber auch anderen meteorologischen Größen.
Durch Veränderung des stomatären Widerstandes kann die Pflanze auf wechselnde Umweltbedingungen reagieren. In zahlreichen Labor- und Freilandexperimenten wurde gezeigt, dass Stomata auf Strahlungsmenge, Temperatur, relative Feuchte, VPD, Bodentrockenheit etc. reagieren. Die Pflanze versucht unter verschiedenen Konstellationen der herrschenden Umweltbedingungen jeweils, den bestmöglichen Kompromiss zwischen Verhungern (zuwenig CO_2-Aufnahme) und Verdursten (zuviel H_2O-Abgabe) zu finden.

Gruppe 1: Wasserpotentialbestimmung mit verschiedenen Methoden und von verschiedenen Geweben

Die Bestimmung des Wasserpotentials in der Pflanze oder im Substrat ist relativ kompliziert (im Vergleich mit der Messung in der Luft). Es gibt für diesen Zweck eine Reihe von Methoden wie z.B.:

- Kapillarmessung zur Messung des statischen Wasserpotentials von Flüssigkeiten, Quellkörpern und Böden (Ursprung und Blum, 1930).
- Die Hebelmethode zur Messung des Wasserpotentials von Hartlaub und anderen schwierigen Objekten ((Ursprung und Blum, 1930).
- Schardakow-Methode (Rehder und Kreeb, 1964; Brauner und Bukatsch, 1973)
- Scholander Apparatur (Scholander, Hammel, Bradstree and Hemmingsen, 1964)
- Hygrometrische und psychrometrische Nachweismethoden zur Taupunktbestimmung

Die Gruppe 1 führt zu diesem Themenbereich die folgenden Versuche durch:

a) Blattwasserpotentialbestimmung nach Scholander
b) Blattwasserpotentialbestimmung mit dem Blattpsychrometer
c) Einfache Methode zur Bestimmung des Wasserpotentials in Kartoffelknollen.

Versuchsmaterial
Die Versuchsteile a) und b) befassen sich mit dem Thema Trockenstress. Es werden Messungen an Blättern von *Zea mays* (C4-Stoffwechseltyp) und *Phaseolus vulgaris* (C3-Stoffwechseltyp) durchgeführt.

Bei der Nachbesprechung sollen die folgenden Fragen beantwortet oder Themen erläutert werden:

1) Erläutern Sie die verwendete Methode und deren Aussagekraft ! Vergleichen Sie kritisch die Scholanderapparatur mit der Psychrometrie !
2) Warum kann das Wasserpotential in bar gemessen werden ?
3) Erläutern Sie die Wasserbilanz der Versuchspflanzen im Spannungsfeld Boden-Pflanze-Atmosphäre !
4) Vergleichen sie die Wasserpotentiale von Pflanzen die ausreichend mit Wasser versorgt wurden mit denen von trockengestressten Pflanzen !

Versuch a) Wasserpotentialbestimmung nach Scholander

Druckbombenmethode nach Scholander

Scholander und Mitarbeiter griffen Mitte der sechziger Jahre eine Konstruktion von Dixon (1914) auf und verbesserten dessen Apparatur zur Messung des „Saftdruckes" von Pflanzen. Mit ihrer Druckbombe, oft auch als Scholanderbombe bezeichnet, schufen sie eine Möglichkeit, auf einfache, schnelle und zuverlässige Weise das Gesamtwasserpotential von ganzen Pflanzen, Zweigen, Blättern oder sogar Blattstücken zu bestimmen.

Prinzip

In einer transpirierenden Pflanze steht der Wasserfaden im Xylem unter einem Unterdruck. Wird ein Blatt oder ein Zweig von dieser Pflanze abgeschnitten, muß sich die „Xylemspannung" entspannen und der Meniskus des Xylemsaftes sich in die Gefäße zurückziehen. Baut man nun das Blatt bzw. den Zweig so in ein Druckgefäß (Druckbombe) ein, dass der Stiel aus dem Deckel herausragt und erhöht im Druckgefäß solange den Innendruck bis der Meniskus wieder an der Schnittfläche auftaucht, muß der dann in der Bombe herrschende positive Druck dem vor dem Abschneiden in Xylem bestehenden negativen Druck entsprechen.
Diesen kann man in erster Näherung dem Blattwasserpotential gleichsetzen. Die Methode eignet sich gleichermaßen gut für den Labor- und den Freilandeinsatz. Eine Scholanderbombe funktioniert ohne elektronische Bauteile und ist deshalb wenig störanfällig und sehr verlässlich. Sie ist außerdem noch vergleichsweise billig in der Anschaffung. Es verwundert daher nicht, dass die Druckbombe nach Scholander die am häufigsten verwendete Apparatur zur Bestimmung des Gesamtwasserpotentials ist.

Aufbau der Druckbombe:

Der Hauptgrund, dass sich das System von Dixon nicht durchsetzen konnte, lag wohl in der unsicheren Konstruktion der gläsernen Druckkammer begründet. Diese Probleme sind durch die von Scholander eingeführten Verbesserungen überwunden. Moderne Druckbomben werden aus Aluminium, Stahl oder rostfreiem Stahl hergestellt. Solche Druckgefäße können je nach Auslegung Überdrücken bis zu l0 MPa und mehr problemlos standhalten.

Alle Scholanderbomben sind prinzipiell nach dem gleichen Schema aufgebaut (siehe Abbildung). Zur Erzeugung des notwendigen Überdruckes wird entweder Stickstoff oder Druckluft aus Druckflaschen verwendet. Durch ein Reduzierventil kann der Flaschendruck auf einen gewünschten Wert erniedrigt werden. Das Feinventil, mit dem der Gasdruck in der Bombe genau eingestellt werden kann, ist oft durch einen Zweiwegehahn gesichert. Mit diesem kann man den Gasweg von der Druckflasche zum Druckgefäß vollständig sperren. Zur Messung des angelegten Druckes dient ein hochauflösendes Manometer, das durch ein Überdruckventil geschützt sein sollte. Es ist sinnvoll, auswechselbare Manometer zu verwenden, die den jeweils erwarteten Wasserpotentialbereich abdecken. Die Druckkammer selbst kann bei manchen Modellen

ausgetauscht und so ein Gefäß angebaut werden, dessen Volumen der Größe des Versuchsmaterials entspricht. Der Verschlussdeckel der Kammer wird entweder mit einem Gewinde oder, günstiger, mit einem Bajonettverschluss auf dem Gefäß verriegelt. Die einzelnen Typen von Druckbomben unterscheiden sich auch in der Art der verwendeten Dichtung, in die der Blattstiel oder Zweig eingesetzt wird. Im einfachsten Fall wird in eine Vertiefung im durchbohrten Deckel ein aufgeschnittener Gummistopfen gesetzt. Dieser wird durch den Kammerdruck gegen den Deckel abgedichtet. Bei anderen Typen kann man die Dichtung von oben her austauschen. Diese Konstruktion hat den Vorteil, dass man Dichtungen mit unterschiedlichen Öffnungen einsetzen kann. Die Bohrungen können rund sein, wenn Ästchen oder Blätter mit langen Blattstielen gemessen werden sollen. Für Grasblätter können sie schlitzförmig oder auch speziellen Bedürfnissen angepasst sein. Als Material für die Dichtungen bietet sich entweder Gummi oder Silikon an.

Zur Beobachtung der Schnittfläche sollte möglichst ein Binokular verwendet werden. Dies erleichtert die Beobachtung und schützt die Augen des Experimentators. Alternativ kann man auch eine Handlupe benützen. Dann ist es aber ratsam, eine Schutzbrille zu tragen und nicht direkt über dem Deckel zu beobachten, sondern immer schräg von der Seite. Bei höheren angelegten Drücken kann es vorkommen, dass ein Blattstiel gequetscht und durch die Dichtung geschossen wird.

Eine Scholanderbombe sollte nie mit Öl gereinigt werden, da sonst beim Anlegen eines Druckes die Gefahr einer Explosion besteht. Man darf grundsätzlich nicht vergessen, dass die Arbeit mit einem Druckgefäß immer gefährlich sein kann, auch wenn die Konstruktion an sich sehr sicher ist.

Theorie der Messung

Durch direkte Messung und durch indirekte experimentelle Ansätze konnte gezeigt werden, dass in den Leitelementen des Xylems einer transpirierenden Pflanze ein Unterdruck, eine Spannung herrscht. Das heißt, das Druckpotential im Xylem ist negativ.

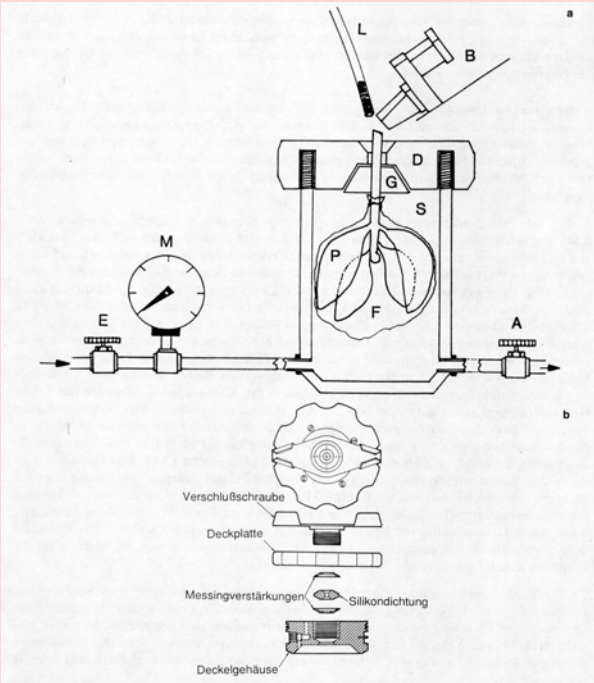


Abb. 8.34 (a) Schematischer Aufbau einer Druckbombe nach Scholander mit einfacher Gummidichtung und Schraubdeckel. Die hier vorgestellte Scholanderbombe ist mit gesonderten Einlaß- bzw. Auslaßventilen (E bzw. A) versehen. Als Dichtung, in die eine in Aluminiumfolie (F) gehüllte Probe (P) eingelegt wird, dient ein durchbohrter, aufgeschnittener Gummistopfen (G). Dieser wird beim Einbau nur in eine Vertiefung im Deckel (D) gedrückt. Der Druck in der Edelstahlkammer (S) kann mit dem Manometer (M) überwacht werden. Die Schnittstelle am Zweig kann durch ein Binokular (B) beobachtet und mittels eines Lichtleiters (L) einer Kaltlichtquelle optimal ausgeleuchtet werden. **(b)** Bei anderen Druckbomben wird anstelle des in Teilabb. **a** gezeigten Systems ein Deckel mit Bajonettverschluß und auswechselbaren, außerhalb des Druckgefäßes eingebauten Silikondichtungen verwendet. Die Dichtungen sind noch durch Messingverstärkungen stabilisiert.

Versuch b) Wasserpotentialbestimmung mit dem Blattpsychrometer

Meßsystem und -prinzip

Im Rahmen des vorliegenden Praktikumsversuchs soll eine hygrometrische und psychrometrische Nachweismethode zur Taupunktbestimmung verwendet werden. Als Apparatur steht ein WESCOR Psychrometer zur Verfügung. Die Gebrauchsanweisung für das WESCOR Psychrometer finden Sie an Ihrem Arbeitsplatz.

PRINZIP DER PSYCHROMETRISCHEN METHODE

Psychrometer mit Thermoelementen gewährleisten Messungen des Wasserpotentials *in situ* (z.B. an Blättern) oder in abgeschlossenen Probenkammern. Sie messen die relative Feuchtigkeit der Umgebung, einem Parameter der eine lineare Beziehung zum Wasserpotential in einem Bereich von 0 bis annähernd –7 MPa aufweist.

Im Rahmen der konventionellen oder psychrometrischen Methode wird ein im Probenraum befindliches Bimetall (Verbindungsstelle zweier Drähte aus Kupfer und Constantan) durch den Durchfluss eines elektrischen Stroms (Peltier Element) gekühlt. Ein zweites Referenzelement befindet sich außerhalb des Probenraums. Ein Temperaturunterschied von 1 °C bewirkt eine Spannung von 40 µV zwischen den Thermoelementen.

Im Rahmen der Messung erfolgt eine Abkühlung bis zu einer Temperatur unterhalb des Taupunkts und bewirkt die Kondensation von Wasser am Peltier Element. Bei der anschließenden Aufwärmung entzieht das oberhalb des Taupunkts evaporierende Wasser dem Peltier Element Wärme (Verdampfungswärme). Die Temperaturabnahme hängt von der relativen Feuchtigkeit und der Temperatur der umgebenden Luft ab; je trockener (und wärmer) die Luft, um so höher ist die Evaporationsrate und umso größer ist die Temperaturabnahme. Die Temperaturunterschiede zwischen den Thermoelementen ist eine explizite Funktion der relativen Feuchtigkeit and somit des Wasserpotentials der Messprobe. In Anlehnung an die Beziehung des Temperaturunterschieds zur Spannung zwischen den Thermoelementen haben Psychrometer einen Ausgang von 0,047 µV * MPa^{-1} (0,47 µV * bar^{-1}) bei 25 °C.

PRINZIP DER TAUPUNKTMETHODE

Bei der psychrometrischen Methode ist die Temperatur am Peltierelement im Probenraum bei Wasserevaporation von der Oberfläche immer niedriger als die Umgebungstemperatur außerhalb der Kammer aber höher als der Taupunkt. Diese Tatsache wird offensichtlich wenn man bedenkt, dass beim Taupunkt keine Evaporation stattfinden würde. Diese einfache Beobachtung ist die Grundlage für die Taupunktmethode. Bei dem Taupunkt würde ein nasses Thermoelement weder Wasser durch Evaporation verlieren noch zusätzlich durch Kondensation erhalten. Nehmen Sie an, dass die Temperatur eines Thermoelements ausschließlich durch die Kondensation oder Evaporation von Wasser beeinflusst wird. Ist die Temperatur oberhalb des Taupunkts wird Wasser von der wasserbedeckten Oberfläche des Thermoelements evaporieren und die Temperatur wird sinken bis der Taupunkt erreicht ist. Zu diesem Zeitpunkt endet die Evaporation. Ist die Temperatur unterhalb des Taupunkts wird Wasser an der Oberfläche des Thermoelements kondensieren und die Kondensationswärme wird die Temperatur bis zum Taupunkt anheben. Zu diesem Zeitpunkt endet die Kondensation.. In beiden Fällen strebt das System auf die Temperatur des Taupunkts zu.

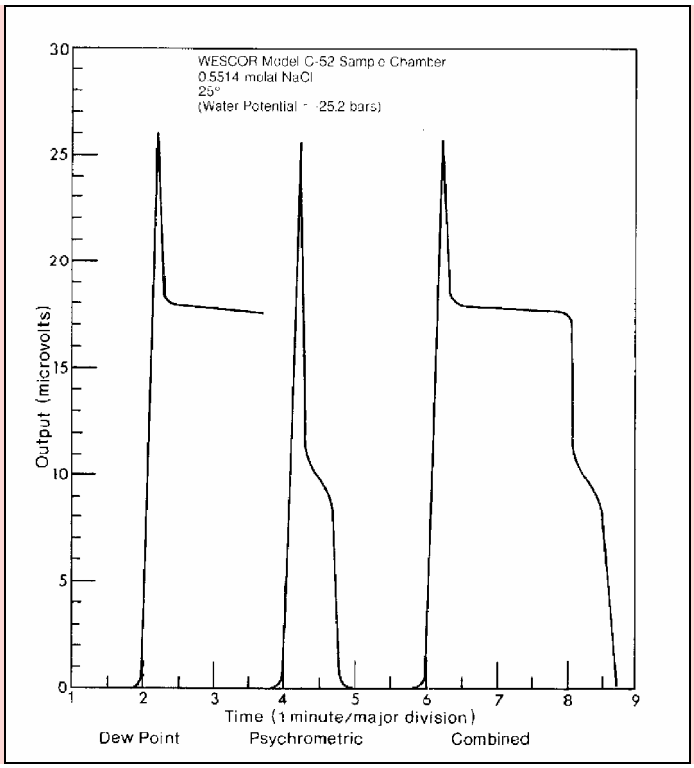


Abb.1 Spannungskurven für die Taupunktmethode, die psychrometrische Methode und eine Kombination von beiden.

Wasserpotentialsbestimmung in Bodenlösungen und in Blättern
Im Rahmen des vorliegenden Praktikumsversuchs soll eine hygrometrische und psychrometrische Nachweismethode zur Taupunktbestimmung verwendet werden. Als Apparatur steht das WESCOR Psychrometer zur Verfügung. Die Gebrauchsanweisung für das WESCOR Psychrometer finden Sie an Ihrem Arbeitsplatz.

Versuch c) Einfache Meßmethode zur Bestimmung des Wasserpotentials in der Zuckerrübe oder in der Kartoffel

Durchführung:
Aus einer 1 mol Saccharoselösung wird durch Verdünnung mit Aqua dest. in große Reagenzgläser eine Konzentrationsreihe von 0.1 bis 1.0 mol (Stufen von 0.1 mol) hergestellt jeweils 1 Parallele). Aus Zuckerrüben werden mit einem Korkbohrer Gewebezylinder (2 x 10 Stück) herausgeschnitten und auf gleiche Länge (4, 5 oder 6 cm) gekürzt. Es ist sehr wichtig das die Gewebestückchen dabei nicht zu lange trocken liegen. Jeweils 1 Gewebezylinder wird in ein mit Saccharoselösung gefülltes Reagenzglas überführt. Die Reagenzgläser werden wahrend des Versuchs in ein auf 20 °C temperiertes Wasserbad gestellt . Nach 3 h werden die Gewebestückchen entnommen und ihre Lange mit Millimeterpapier bestimmt. Die Molaritätsstufe an der keine Längenänderung festgestellt werden konnte entspricht dem Wasserpotential des Rübengewebes. Der entsprechende osmotische Wert kann aus der Tabelle abgelesen werden.

Auswertung: Stellen Sie die Volumenveränderung (δV) graphisch dar und erklären Sie die Effekte. Welches Wasserpotential besitzt das Rübengewebe?

Gruppe 2: Einfache Methoden zur Bestimmung des Osmotischen Potentials

Die Gruppe 2 führt zu diesem Themenbereich die folgenden Versuche durch:

a) Demonstrationsversuch zur Verdeutlichung des Messprinzips (wird nicht im Praktikum durchgeführt): Messung des osmotischen Werts von Presssäften mit der Kryoskopie
b) Bestimmung des Osmotischen Potentials mit dem Kryo-Osmometer
c) Vergleich mit Versuch a) Bestimmung des osmotischen Potentials mit dem Psychrometer

Versuchsmaterial:

Versuchsmaterial und Fragestellung

Es soll das osmotische Potential von Halophytenblättern bestimmt werden. Halophyten sind salztolerante Pflanzen die z.B. im Meerwasser vorkommen. Die Bodensalinität bewirkt eine Abnahme des Wasserpotentials. Im Gewächshaus stehen 5 gleiche Kulturen die sich nur durch den Salzgehalt der Nährlösung (im Substrat) unterscheiden. Bitte erstellen sie Diagramme aus denen der Einfluss von Salinität auf den osmotischen Wert hervorgeht. Wie unterscheiden sich die Ergebnisse der Versuche b) und c) ? Diskutieren Sie die Vor- und Nachteile der verwendeten Messmethoden !

Versuch a) Demonstrationsversuch zur Verdeutlichung des Messprinzips (wird nicht im Praktikum durchgeführt): Messung des osmotischen Werts von Presssäften mit der Kryoskopie

Versuchsobjekte: Presssaft von Zuckerrübe, Zitrone, Apfelsine, Apfel etc.

Versuchsdurchführung:

In dem großen Gefäß des Beckmann Kryoskops wird eine handvoll NaCl (Streusalz, Viehsalz o.ä.) mit Wasser gelöst. Eis wird hinzugegeben bis die Kältemischung etwa 15 bis 17 °C beträgt.

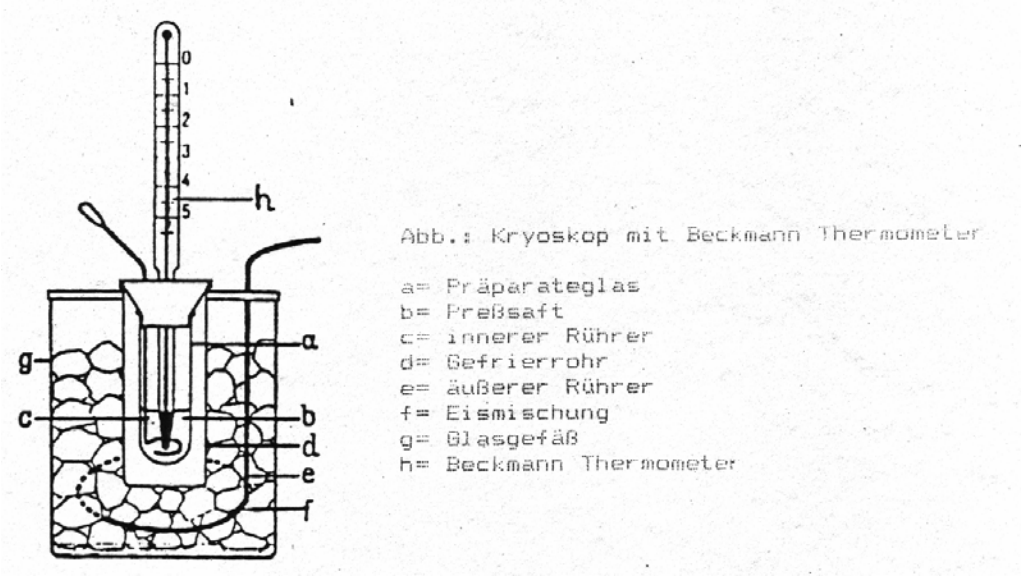


Abb.: Kryoskop mit Beckmann Thermometer

a= Präparateglas
b= Preßsaft
c= innerer Rührer
d= Gefrierrohr
e= äußerer Rührer
f= Eismischung
g= Glasgefäß
h= Beckmann Thermometer

Breites Reagenzglas, Gefrierrohr, Präparateglas und Beckmann Thermometer werden wie nach der Abbildung zusammengefügt. Der Presssaft wird in das Gefrierrohr gefüllt und bis ca. –3 °C vorgekühlt (ohne zu gefrieren !). Nach Erreichen dieser Temperatur wird vorsichtig gerührt. Durch das Reiben mit dem Rührer an der Glaswand bilden sich Kristallisationskeime und die Lösung

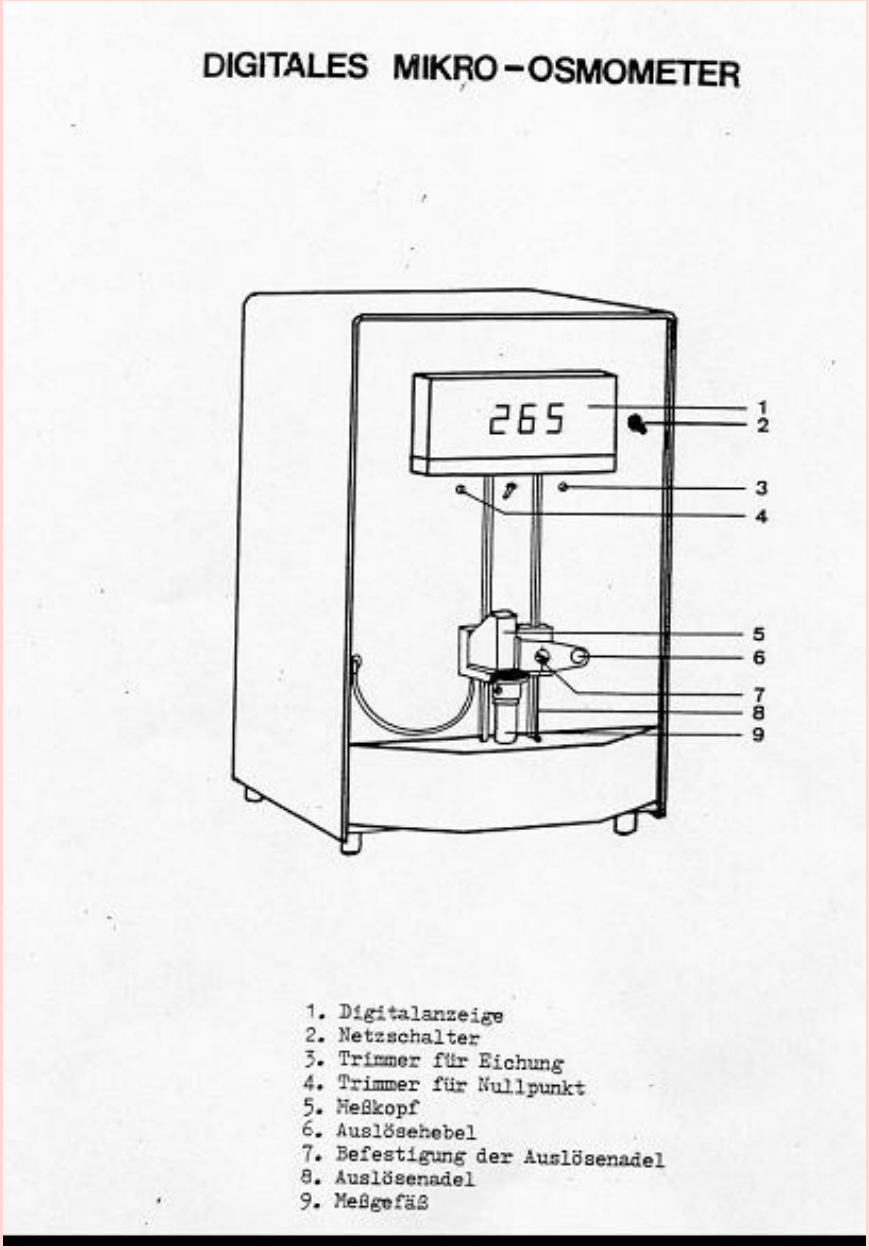
gefriert unter Freisetzung der Schmelzwärme. Die Temperatur die einige Zeit konstant bleibt entspricht dem Gefrierpunkt des Presssafts. Der Saft wird anschließend wieder aufgetaut und die ganze Prozedur wird 3 mal wiederholt. Die Eichung des Beckmann Thermometers erfolgt mit Wasser.
Die molale Gefrierpunktserniedrigung (GE) ist eine Konstante des Lösungsmittels und beträgt für Wasser 1,86 °C. Die Gefrierpunktserniedrigung einer beliebigen wässrigen Lösung ist dann:

$$\delta T = GE * m$$

Auswertung: Berechnen Sie den osmotischen Wert (π) des Presssafts.

Versuch b) Bestimmung des Osmotischen Potentials mit dem Kryo-Osmometer

Bedienungsanleitung und Messprinzip



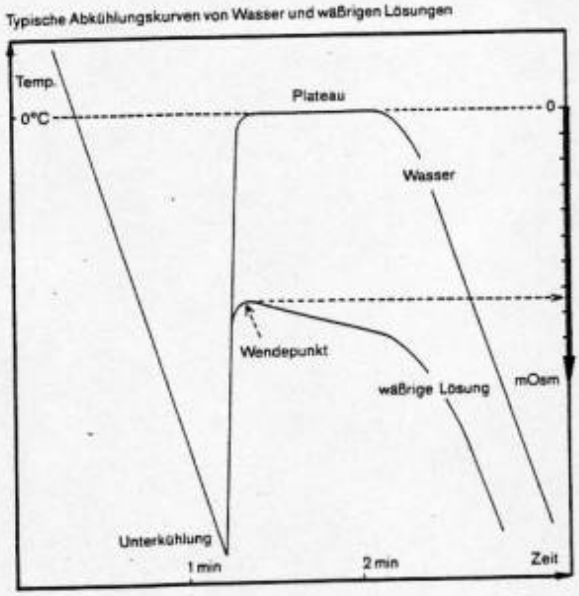
B) Meßprinzip:

Es wird der Gefrierpunkt von wäßrigen Lösungen gemessen. Die Gefrierpunktserniedrigung im Vergleich zum Gefrierpunkt des reinen Wassers ist ein direktes Maß für die osmotische Konzentration. Reines Wasser gefriert bei 0°C, eine wäßrige Lösung mit der Osmolalität von 1 Osmol/kg Wasser bei −1,858 °C.

Zunächst hat die Probe Raumtemperatur. Nachdem sie in das Meßgefäß gefüllt ist, wird sie mit diesem an den Meßkopf gesteckt. Danach wird der Meßkopf an seiner Führung runtergeschoben, wobei das Meßgefäß in die trichterförmige Kühlöffnung eintaucht. Nun kühlt die Probe ab. Die Digitalanzeige zeigt absinkende Werte an. Nach dem Unterschreiten von 0°C werden steigende negative Werte angezeigt.

In sauberen Gefäßen lassen sich wäßrige Lösungen (Körperflüssigkeiten) gut unterkühlen, d. h. die Probe gefriert nicht, obwohl der Gefrierpunkt bereits unterschritten ist. Bei einer bestimmten Unterkühlung (wenn die Digitalanzeige −1000 anzeigt) wird eine kalte Nadel in die Probe eingetaucht. Damit wird die Eisbildung eingeleitet. Nun steigt die Temperatur wieder an, bis sich der Gefrierpunkt in der Probe eingestellt hat. Der sich einstellende Wendepunkt ist der Meßwert.

Typische Abkühlungskurven von Wasser und wäßrigen Lösungen



Bei reinem Wasser ist es ein länger anhaltendes Plateau, bei Lösungen ein einige Sekunden dauernder Wendepunkt. Da die Unterkühlung einige °C beträgt, die Gefrierpunkte aber nur etwa −0,5°C betragen, muß zur genauen Ablesung der Gefrierpunkte die Anzeige des Digitalvoltmeters gespreizt werden. Diese Umschaltung geschieht halbautomatisch beim Betätigen der Auslösenadel. Da die Osmolalität und die Gefrierpunktserniedrigung in direktem Zusammenhang stehen, erfolgt die Digitalanzeige nicht in °C, sondern in Milliosmol.

C) Bedienung des DIGITALEN MIKRO-OSMOMETERS

Als Meßgefäße haben sich die Reagiergefäße der Firma Sarstedt/5223 Nümbrec Rommelsdorf, Bestell-Nr. 39/10 A, gut bewährt. Auf diese Gefäße ist der Th mistor bei Auslieferung des Gerätes justiert. Sollen andere Meßgefäße ver- wendet werden, muß die Thermistorstellung überprüft und ggf. neu justiert werden. (Siehe Seite 4)

Von der Verwendung unsymmetrischer Meßgefäße wird abgeraten.

Eichung mit destilliertem Wasser:

Netzschalter einschalten. Anlaufzeit ca. 3 Minuten.

1. 100 µl destilliertes Wasser in eines der mitgelieferten Meßgefäße pipettie ren. Die Probenmenge soll auf + -10 % genau sein.
2. Das Meßgefäß an den Meßkopf stecken.
3. Den Meßkopf runterschieben, wobei das Meßgefäß in die Kühlöffnung eintauch
4. Nach etwa einer Minute ist die Unterkühlung erreicht. Es ertönt ein Summto
5. Bei -1000 wird die Auslösenadel aus ihrer Kühlöffnung gehoben und ca. 1 se lang in die Probe getaucht. Danach wird sie wieder zurückgestellt. Hierfür ist folgender Bewegungsablauf nötig: Den Hebel mit dem roten Knopf mit Daumen und Zeigefinger anfassen, bis zum Anschlag nach oben schieben (Scha schaltet um), nach links schwenken, nach unten schieben (Nadel muß in die Probe eintauchen) und wieder zurück. Nach der Umschaltung werden Milliosmo mit positivem Vorzeichen angezeigt.
6. Während sich das Plateau einstellt, muß mit dem linken Trimmer auf der Fro platte die Digitalanzeige auf Null einreguliert werden. Hierfür hat man et 1/2 Minute Zeit. Sobald die Werte wieder steigen, ist das Plateau vorbei (siehe Diagramm).
7. Meßkopf hochschieben. Achtung: Wenn eine Probe vollständig durchgefroren ist (bei Wasser am Ende des Plateaus), muß erst das Meßgefäß mit den Finge angewärmt werden, bevor es abgezogen wird!
8. Meßgefäß abziehen, Thermistor mit einem weichen Tuch abwischen, Meßgefäß säubern.

Eichung mit Standard:

1. 2 Tropfen (=100 µl) 300mOsm-Standard aus der mitgelieferten Flasche ein- füllen. (Flasche stets verschlossen halten!)
2. bis 5. wie oben
6. Im Wendepunkt bleibt die Anzeige für ca. 5 sec. stabil. Innerhalb dieser Zeit muß mit dem rechten Trimmer auf der Frontplatte die Einregulierung auf + 300 vorgenommen werden. (Hierzu gehört etwas Erfahrung. Ist man mit dem Osmometer noch nicht vertraut, ist es empfehlenswert, sich den Verlau der Anzeige erst einmal anzusehen, bevor man die Eichung vornimmt.) Bei Unsicherheiten sollte man eine weitere Messung zur Kontrolle durchführen. Für jede Messung sollte neu pipettiert werden.
7. Weiter wie oben.

Pressaftgewinnung
Die Extraktion des Presssaftes erfolgt mit der Knoblauchpresse. Die so gewonnenen Probe wird in einem Eppendorfgefäss aufgefangen und 1 min bei 60 °C im Wasserbad gekocht. Festpartikel werden durch Zentrifugation in den Eppendorfgefässen (1,5 ml) bei höchstmöglicher Drehzahl in einer Labofuge sedimentiert (Wichtig: nur mit Gegengewicht zentrifugieren !).

Messung:
Der Presssaft (ca. 150 µl) wird in eine Messküvette gefüllt das über einem Thermistor-Temperaturfühler am Messkopf des Osmometers geschoben wird. Der Thermistor taucht in die Lösung ein und misst die Temperatur. Der Messkopf wird auf das Osmometer gestellt wobei die Messküvette in das Kühlfach eintaucht. Die Probe wird darin thermoelektrisch gekühlt. Bei einer definierten Unterkühlung (V) wird das Gefrieren durch einen Vibrator ausgelöst. Die Temperatur der Lösung steigt nun auf den Gefrierpunkt an. Diese Gefriertemperatur wird nun mit Hilfe des Thermistors elektronisch gemessen und am Messgerät direkt in mosmol/kg angezeigt. Nach der Messung muss die Lösung vor dem Entfernen der Messküvette vollständig aufgetaut sein ! Die Messung wird 3 mal wiederholt. Die Eichung des Osmometers erfolgt mit aqua dest und einem Fertigstandard (400 mosmol/kg NaCl).

Versuch c) Bestimmung des osmotischen Potentials mit dem Psychrometer

Dieser Versuch dient dem Methodenvergleich von Kryoskopie (Versuch b)) und Psychrometrie. Nähere Informationen zum Messprinzip der Psychrometrie sind im Kapitel *„Gruppe 1: Wasserpotentialbestimmung mit verschiedenen Methoden und von verschiedenen Geweben“* nachzulesen,

Zur Vorbereitung der psychrometrischen Messung werden zunächst Presssäfte von den Blättern hergestellt (je 3 Parallelen; Probenaufarbeitung siehe Kryoskopie). Die Messung der Nährlösungen und der Presssäfte erfolgt anschließend mit dem WESCOR Probenkammer-Psychrometer C-52 (Abb. 3).

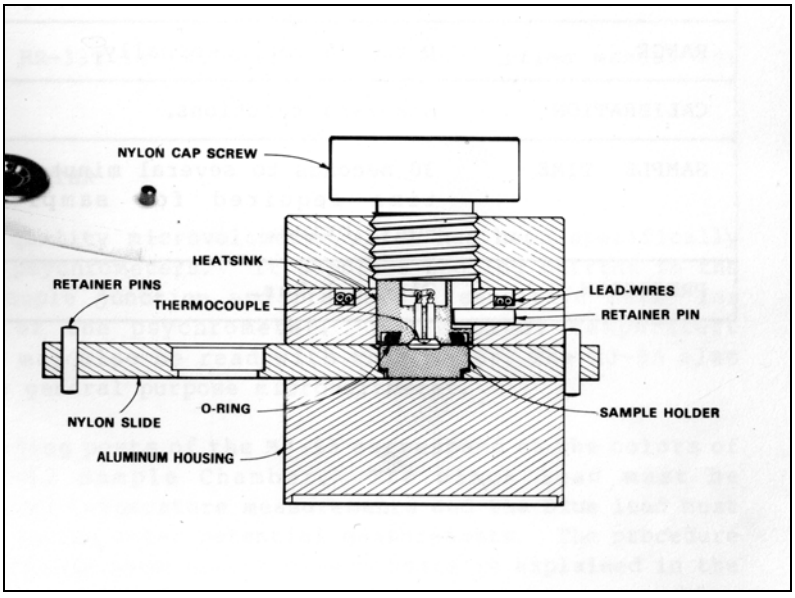


Abb.2: Schematische Darstellung des WESCOR Probenkammer-Psychrometers C-52.

Zur Auswertung gehört a) die Erstellung der Standardkurven, b) die Bestimmung der osmotischen Potentiale in Presssäften von Blättern. Diskutieren Sie kritisch die Fehlerquellen der verwendeten Methoden. Welche Vor- und Nachteile haben andere Bestimmungsmethoden ?
Interpretieren Sie die Ergebnisse und diskutieren Sie die ökologische und physiologische Relevanz. Welche Probleme entstehen bei der Übertragung der Ergebnisse auf natürliche Kulturbedingungen wie sie z.B. auf Marschland auftreten ?

Versuch d) Bestimmung des osmotischen Werts mit dem Refraktometer

Bedienungsanleitung und Messprinzip des Refraktometers
(aus Wikipedia, der freien Enzyklopädie)

Das Refraktometer ist eine Messeinrichtung zur Bestimmung der Brechzahl von optischen Medien. Dabei wird meist die Brechung (Refraktion) oder die Totalreflexion des Lichtes ausgenutzt. Bekannte Refraktometer sind beispielsweise:

* Abbe-Refraktometer
* Pulfrich-Refraktometer
* Wollastons-Refraktometer (1802)

Auf diesem Prinzip basieren Geräte zur Bestimmung der Reife des Weines (Mostgewicht), des Frostschutzes von Kühlflüssigkeit oder aber der Säuredichte des Elektrolytes einer Batterie. Ebenso kann so der Anteil gelöster Substanzen, z. B. die Salinität von Meerwasser gemessen werden.

Im angewandten Bereich werden Refraktometer besonders zur Bestimmung des Mostgewichts eingesetzt. Das Mostgewicht bezeichnet den Anteil gelöster Stoffe im Traubenmost (Traubensaft) und ist ein wichtiges Qualitätskriterium bei der Wein-Herstellung. Als Maßeinheit wird in Deutschland meist das Grad Öchsle verwendet, in Österreich die Zuckergrade der KMW, der Klosterneuburger Mostwaage.

Nach dem Mostgewicht erfolgt die Einteilung der Weine in verschiedene Güteklassen. Dafür sind vom Gesetzgeber in einigen nationalen Weingesetzen (Deutschland, Österreich) bestimmte Mindestmostgewichte festgelegt worden.

In Deutschland werden die Stufen

1. Kabinett
2. Spätlese
3. Auslese
4. Beerenauslese
5. Trockenbeerenauslese

nach dem Mostgewicht unterschieden.

Das Messprinzip des Refraktometers beruht auf der Lichtbrechung (Physik). Brechung bezeichnet die Richtungsänderung einer Welle aufgrund einer lokalen Änderung ihrer Ausbreitungsgeschwindigkeit, die durch den Brechungsindex beschrieben wird. Treffen elektromagnetische Wellen wie z.B. Licht von einem Medium (z.B. Luft) auf ein anderes (z.B. Glas), dessen Brechungsindex sich von dem des ersten unterscheidet, wird ein Teil des Lichts reflektiert, ein anderer erfährt eine Ablenkung gemäß dem Snelliusschen Brechungsgesetz.

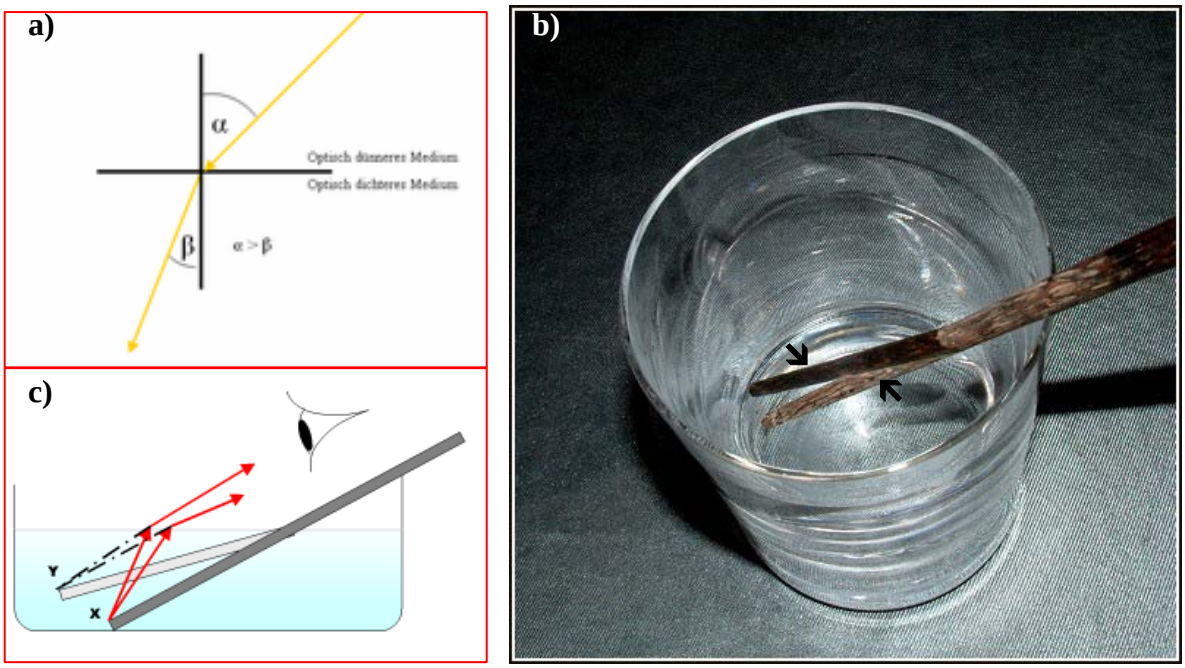


Abb.: a) Darstellung der Brechung eines Lichtstrahls (gelb) beim Eintritt in ein optisch dichteres Medium (z.B. Wasser) von einem optisch dünnerem Medium (z.B. Luft). b) Vergleich eines Bleistiftstabs im leeren Glas (↖) und noch einmal eingetaucht in Wasser (↘).c) Schemazeichnung zur Erklärung des Effekts in b).

Dieser Versuch dient dem Methodenvergleich von Kryoskopie (Versuch b)), Psychrometrie c)) und Refraktometrie. Nähere Informationen zum Messprinzip der Psychrometrie sind im Kapitel *„Gruppe 1: Wasserpotentialbestimmung mit verschiedenen Methoden und von verschiedenen Geweben“* nachzulesen,

Zur Vorbereitung der refraktometrischen Messung werden zunächst Presssäfte von den Blättern hergestellt (je 3 Parallelen; Probenaufarbeitung siehe Kryoskopie). Die Messung der Nährlösungen und der Presssäfte erfolgt anschließend mit dem ATAGO Hand-Refraktometer .

Versuch e) Bestimmung des osmotischen Werts mit dem Leitfähigkeitsmessgerät.

Theorie und Messprinzip der Leitfähigkeit
(aus Wikipedia, der freien Enzyklopädie)

Als Leitfähigkeit bezeichnet man die Fähigkeit eines chemischen Stoffes oder Stoffgemisches, physikalische Parameter oder andere Stoffe im Raum zu transportieren. Man unterscheidet

- Elektrische Leitfähigkeit (für elektrischen Strom)
- Wärmeleitfähigkeit/Thermische Leitfähigkeit (für Wärme)
- Akustische Leitfähigkeit (für Schall)
- Kapillare Leitfähigkeit (für Feuchtigkeit im Bauwesen)

Die Fähigkeit von Stoffen, elektrischen Strom und Wärme zu leiten, ist häufig ähnlich ausgeprägt. So sind Metalle gleichzeitig gute Leiter für elektrischen Strom und für Wärme.

Die elektrische Leitfähigkeit (Formelzeichen σ) ist eine physikalische Größe, die die Fähigkeit eines Stoffes angibt, elektrischen Strom zu leiten. Sie ist definiert als die Proportionalitätskonstante

zwischen der Stromdichte und der elektrischen Feldstärke in der allgemeinen Form des Ohmschen Gesetzes

$$\vec{j} = \sigma \vec{E}$$

Im allgemeinen Fall ist die elektrische Leitfähigkeit daher ein Tensor 2. Stufe, also eine quadratische Matrix. Da jedoch in vielen Fällen die Stromleitung parallel zum elektrischen Feld erfolgt, genügt in der Regel die Angabe als skalare Größe.

Die elektrische Leitfähigkeit ist mit dem spezifischen elektrischen Widerstand ρ über die Formel

$$\sigma = \frac{1}{\rho}$$

verknüpft. In Anlehnung an die Tatsache, dass der Leitwert der Kehrwert des Widerstandes ist, wird die elektrische Leitfähigkeit oft spezifischer Leitwert genannt.

Nach der elektrischen Leitfähigkeit unterteilt man Stoffe in Leiter (insbesondere alle Metalle), Isolatoren oder Nichtleiter (die meisten Nichtmetalle sowie Kohlenwasserstoffe und viele organische Verbindungen) Halbleiter (beispielsweise Silizium, Germanium) und Supraleiter (viele Metalle, verschiedene Legierungen, einige wenige Keramiken und manche Fullerene).

Typische Werte (bei 25°C) für Leiter :

- Silber: 62 · 106 S/m (höchste elektrische Leitfähigkeit aller Metalle)
- Meerwasser: ~ 5 S/m
- Leitungswasser: ~ 0,05 S/m
- reines Wasser: 5 · 10-6 S/m (wird oft auch bereits als Nichtleiter bezeichnet)

Aufgrund der Leitfähigkeit von Salzen kann diese Methode zur Messung osmotischer Werte eingesetzt werden. Dieser Versuch dient dem Methodenvergleich von Kryoskopie (Versuch b)), Psychrometrie (Versuch c)), Refraktometrie (Versuch d) und Leitfähigkeitsmessung (Versuch e).

Zur Vorbereitung der Leitfähigkeitsmessung werden zunächst Presssäfte von den Blättern hergestellt (je 3 Parallelen; Probenaufarbeitung siehe Kryoskopie). Die Messung der Nährlösungen und der Presssäfte erfolgt anschließend mit dem Leitfähigkeitsmessgerät.

Gruppe 3: Einfache Methoden zur Bestimmung des Matrixpotentials, des Wurzeldrucks und des Transpirationssogs

Die Gruppe 3 führt zu diesem Themenbereich die folgenden Versuche durch:

a) Einfache Methode zur Bestimmung des Matrixpotentials von quellenden Samen.
b) Demonstration des Wurzeldrucks anhand „Bluten“ verletzter Pflanzen
c) Transpirationssog

Versuch a) Einfache Methode zur Bestimmung des Matrixpotentials von quellenden Samen.

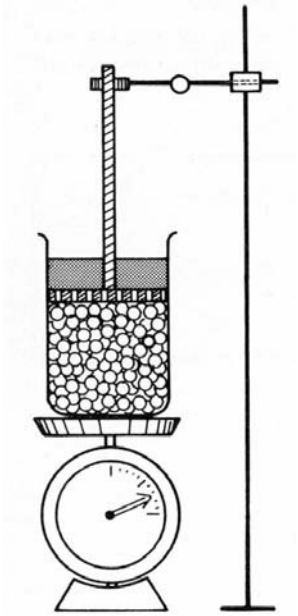
Im Boden bezeichnet man das Matrixpotential als Summe aller Kräfte die durch Boden-Wasser Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Diese **Festkörper-Wasser Wechselbeziehung** gilt auch für trockenen, quellbaren Samen Die Kraft mit der ein Quellkörper Wasser anzieht bezeichnet man als Quellungsdruck τ. Unter **Quellung** versteht man dabei die rein physikalische Flüssigkeits- oder Dampfaufnahme einer hochmolekularen Substanz (Festkörper) unter Volumenvergrösserung. Der Wassereinstrom in einen Quellkörper kann durch einen Gegendruck verhindert werden; dieser

Druck ist betragsgemäß gleich, im Vorzeichen entgegengesetzt dem potentieller Ouellungsdruck τ^*. Dieser Druck reicht hin um selbst starkwandige Flaschen zu sprengen (Vorsicht!).

A) Geräte: Personenwaage, Metallstäbe, Klemmen, 2 Metallstative, Drucküberträger, Konservenbüchse

B) Versuchsobjekt: getrocknete Erbsen, Maissamen, Gerstesamen

C) Durchführung:
In einer stabilen Konservendose wird eine etwa 5 cm hohe Schicht trockener Erbsen mit lauwarmen Wasser übergossen. Dabei sollte der Flüssigkeitsspiegel etwa 1 cm unterhalb des Dosenrandes stehen. Sodann wird eine an einem Metallstab befestigte mehrfach durchbohrte Metallscheibe auf die Oberfläche der Erbsen abgesenkt, bis die Waage anspricht. Das Ausgangsgewicht ist zu protokollieren. Innerhalb weniger Stunden entwickelt sich ein erheblicher Quellungsdruck der am Ausschlag der Waage abzulesen ist (Messung nach 1,2,3 und 24 Stunden).

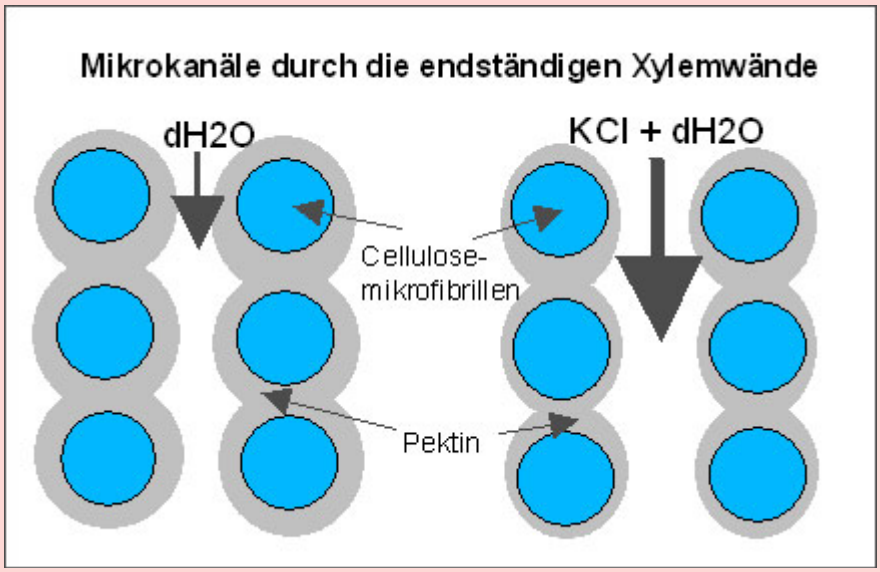


D) Auswertung: Der Quellungsdruck ist in MPa als Funktion der Quellungsdauer auf Millimeterpapier aufragen. In der Nachbesprechung kann als optisch sehr anschauliches Versuchmaterial die Rose von Jericho (Moosfarn. *Selaginella epydophylla* (*Selaginellaceae*)) zur Darstellung des Matrixpotentials eingesetzt werden.

Versuch b) Demonstration des Wurzeldrucks anhand „Bluten" verletzter Pflanzen

Wasser wird in Pflanzen meist von der Wurzel in die Blätter bzw. Sproßspitze transportiert. Selbst in über 100m hohen Mammutbäumen, wie z. B. den Redwoods und Seqouias, kann man den Wassertransport beobachten. Vor ca. 20 Jahren untersuchte man diesen Transport entgegen der Schwerkraft genauer. Es wurden gut gewässerte Pflanzen dekapitiert, dabei konnte man aus der Schnittstelle Pflanzensaft austreten sehen.
Lange zeit galt folgende Hypothese zur Erklärung dieses Phänomens: Dieses Ergebnis spricht für den aktiven Transport von Ionen in den Zentralzylinder der Wurzel durch die Endodermiszellen. Durch den entstehenden osmotischen Gradienten strömt Wasser in den Zentralzylinder nach. Dadurch wird der sogenannte Wurzeldruck aufgebaut, der das Wasser in die Sproßachse drückt. In den toten, passiven Xylemelementen ist keine Regulation möglich.
Neuesten Erkenntnissen zur Folge (Holbrook et al., 2001, Science, V.291, S.1059) ist es nun vorbei mit der passiven Rolle der Xylembahnen. Die Leitungsröhren sind in der Lage, den Transport von

Wasser zu regulieren. Xylemelemente bestehen aus abgestorbenen, verholzten und protoplastenlosen Zellen. Sie weisen verdickte Zellwände auf und sind seitlich durch Leisten versteift. An ihren lateralen Enden sind die Xylemelemente perforiert. Durch diese Perforation bilden sich sogenannte Mikrokanäle aus, durch die das Wasser hindurchfliessen muss, um von einem Xylemelement zum nächsten zu gelangen. Eine interessanter regulatorischer Ansatzpunkt sind die Mikrokanäle. Tatsächlich wird der pflanzliche Wassertransport durch die Xylemelemente über Mikrokanäle durch Pektine reguliert. Untersuchungen haben ergeben, dass deionisiertes Wasser die Vergrößerung der Pektinmatrix zur Folge hat, somit den Kanaldurchmesser verringert und den Wassertransport verlangsamt. Anschließende Untersuchung des Wassertransports unter physiologischen Ionenkonzentrationen (~10mM) zeigte, dass die Pektinmatrix abschwellte und der Wasserfluss zunahm.



Verletzt man eine Pflanze, so beobachtet man eine Saftabscheidung; die Pflanze „blutet". Das „Bluten" der Pflanze wird auf den Wurzeldruck zurückgeführt, der mit diesem Experiment veranschaulicht wird.

Zeitaufwand: Anzucht der Pflanzen: ca. 10 Tage, Durchführung: 20 min
Material: Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris* ssp. *nanus*) oder Boehmeria-Pflanzen
Geräte: dünne Trinkhalme, Rasierklinge, Folienstift
Chemikalien: Vaseline

Messung der Exsudationsrate auf Grund von Wurzeldruck:
Die Pflanzen werden vor der Versuchsdurchführung nochmals gut gegossen. Der Spross wird unterhalb der vorgesehenen Schnittstelle (etwa 5 cm oberhalb der Erdoberfläche gut mit Vaseline eingefettet. Einer Bohnen-Pflanze wird der Spross unterhalb der Blätter abgeschnitten und an seiner Stelle eine 5ml-Meßpipette mit Hilfe einer kurzen Schlauchverbindung aufgesetzt. Dazu zuerst das Schlauchstück auf den Stumpf ziehen, das Schlauchstück mit Wasser füllen und dann die Pipette aufsetzen. Die Markierung notieren an der zu Beginn des Versuches nun das Wasser steht und dann im Abstand von 30min die exsudierte Wassermenge notieren (2 h lang). Die Wasserabgabe wird in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen (x-Achse: Zeit in min, y-Achse: Wasserabgabe in ml).

Beobachtung:
Der Spross beginnt an der Schnittstelle sofort zu bluten. Im Trinkhalm ist ein Ansteigen der Flüssigkeitssäule zu beobachten.

Erklärung:

Der aus der Schnittstelle austretende Blutungssaft wird durch den Wurzeldruck aus den Leitbündeln gepresst. Durch den Wurzeldruck wird die Flüssigkeitssäule gegen die Schwerkraft nach oben gepumpt. Den Hauptantrieb für die Wasserströmung im Xylem stellt allerdings nicht der Wurzeldruck, sondern der Transpirationssog dar.

Bemerkung:
Das direkte Aufsetzen der Trinkhalme auf den Sprossstumpf und das Einfetten des Sprosses mit Vaseline gewährleisten eine gute Abdichtung des Versuchsaufbaus.

Versuch c) Transpirationssog

Kurz und knapp:

Die Transpiration bewirkt infolge der Kohäsionskräfte ein Nachströmen des Wassers (Transpirationssog). Das Wasser-Sättigungsdefizit der Luft erzeugt eine enorme Saugkraft (-200 bis -500kPa), die in der Lage ist sowohl den hydrostatischen Druck der Wassersäule (besonders bedeutsam bei Bäumen), als auch den Reibungswiderstand in den Gefäßkapillaren zu überwinden. Damit das lebenswichtige Wasser aus der Pflanze nicht unkontrolliert verdunstet haben die höheren Pflanzen starke Transpirationswiderstände an der Oberfläche ausgebildet. Die oberirdischen Pflanzenteile sind mit einer wasserabweisenden Cuticula, bzw. ältere Bereiche mit Korkgewebe überzogen. Die Regulation der Transpiration und die lebenswichtige Aufnahme von Kohlendioxid erfolgt über die Stomata. Der Transpirationssog lässt sich mit Hilfe von gefärbtem Wasser an einer lebenden Pflanze demonstrieren.

Zeitaufwand: Durchführung: 20 min
Material: Fleißiges Lieschen, weißblühende Pflanze (z.B. Margerite) oder Sellerie (siehe Abbildungen)
Geräte: Becherglas (50 mL), Rasierklinge
Chemikalien: 0,5 %ige Säurefüchsinlösung

Durchführung:

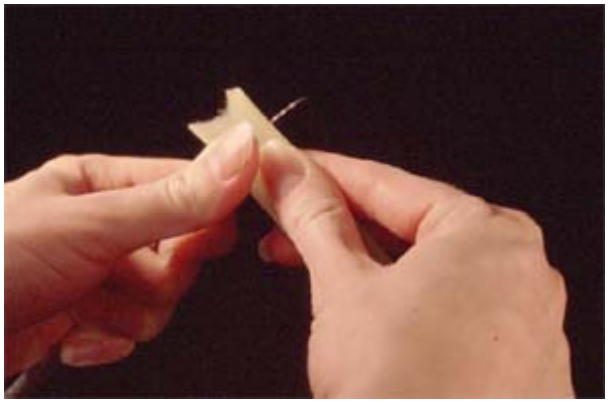
Man schneidet etwa 10 cm lange Sprosse der verwendeten Pflanzen schräg ab und stellt sie sofort in ein mit wenig Säurefüchsinlösung gefülltes Becherglas.

Beobachtung:

Bei der Margerite ist eine Rotfärbung der weißen Blüte zu erkennen. Die Leitbündel des Fleißigen Lieschens färben sich nach 5 Minuten rot. Mit forschreitender Versuchsdauer färben sich auch die Blattstiele und Blattadern rot.

Erklärung:

Die Pflanzen sind in das zwischen Boden (Säurefüchsinlösung) und Luft bestehende Wasserpotentialgefälle eingeschaltet und geben daher Wasser durch Transpiration ab. Der dadurch entstehende Transpirationssog wirkt als „Motor" des Wasserferntransports. Die Säurefüchsinlösung gelangt über das Xylem der Sprossachse in die Blätter und in die Blüte.



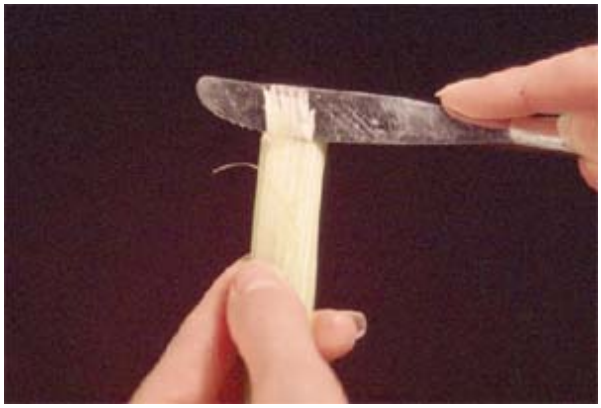


Abb.: Transpirationssog am Beispiel des Selleries

Thema 2: Gaswechsel - Blatt

Bearbeitet von PD Dr. Hans-Werner Koyro

1. Themenbereiche des Kursteils "Gaswechsel - Blatt"

Zwei Gase spielen für Höhere Pflanzen in terrestrischen Ökosystemen eine zentrale Rolle: Wasserdampf, der aufgrund der physikalischen Eigenschaften von Wasser und der großen Unterschiede im Wasserpotential zwischen Pflanze und Luft ständig das Bestreben hat, aus der Pflanze zu entweichen (vergleiche Kursteil *"Wasserhaushalt"*), und Kohlendioxid, das die einzige Kohlenstoff-Quelle für autotrophe Organismen darstellt. Beide Gase haben den gleichen Weg aus der oder in die Pflanze, wodurch höhere Pflanzen vor die Wahl gestellt sind, entweder ihren Wasserverlust klein zu halten zum Preis einer geringen $C0_2$-Aufnahme oder viel $C0_2$ aufzunehmen und gleichzeitig viel Wasser zu verlieren („Gaswechseldilemma“).

Im Kurs sollen die wesentlichen Grundlagen des Gasaustauschs zwischen Blättern und der Umgebungsluft für die Gase Wasserdampf und Kohlendioxid behandelt werden. Am praktischen Beispiel werden die Studierenden Messungen zum Gaswechselverhalten von C_3- und C_4-Pflanzenarten durchführen und die Abhängigkeit vom Strahlungsgenuss erfassen.

2. Theoretische Grundlagen

Der theoretische Hintergrund zu den im Kurs durchgeführten Untersuchungen wird in der Vorlesung „Einführung in die Pflanzenökologie“ vermittelt, die jeweils im Wintersemester gehalten wird. Im Folgenden werden dennoch die wichtigsten Grundkenntnisse und Beziehungen dargestellt. Dieser kurze Abriss kann jedoch den Besuch dieser Vorlesung und das Studium der angegebenen Literatur nicht ersetzen !

Als Literatur für diesen speziellen Kursteil wird empfohlen:

Larcher, Walter (1994): Ökophysiologie der Pflanzen, 5. Aufl. Ulmer, Stuttgart (UTB Große Reihe).
Daraus die Kap. 2.1 (Betriebsstoffwechsel) und 2.2 (Gaswechsel der Pflanze) als generelles Hintergrundwissen; zur Vertiefung in die speziellen, im Praktikum am Beispiel behandelten Fragestellungen insbesondere die Kap. 2.2.-1 (Austausch von Kohlendioxid und Sauerstoff), 2.2.2 (Leistungsvermögen der Nettophotosynthese) und 2.2.5 (Wirkung von Außenfaktoren auf den $C0_2$-Gaswechsel).

Steubing, Lore & Fangmeier, Andreas (1992): Pflanzenökologisches Praktikum. Ulmer, Stuttgart (UTB Große Reihe).
Als Vorbereitung für den praktischen Teil wird der Versuch 121 (Photosynthesemessung) empfählen. Neben Funktionsweise und Handhabung der Geräte werden dort auch jeweils kurz die theoretischen Grundlagen in leicht verständlicher Form abgehandelt. Im Anhang finden sich die benötigten Angaben zur Umrechnung physikalischer Einheiten.

Von Willert, Dieter J., Matyssek, Rainer & Herppich, Werner (1995): Experimentelle Pflanzenökologie. Thieme, Stuttgart.

In diesem Werk werden theoretische Grundlagen, methodische Möglichkeiten und Messtechniken für die im Kurs durchgeführten Messungen sehr detailliert und mit umfangreichen mathematischen Formeln dargestellt.

3. CO_2-Gaswechsel (Photosyntheserate und Atmungsrate)

Auf gleichem Weg, wie Wasserdampf die Pflanze verlässt, wird CO_2 während der Photosynthese aufgenommen oder während der Atmung abgegeben. Für den $C0_2$-Gaswechsel J_{C02} gilt dann ähnlich wie für die Transpirationsrate (vergl. Kursteil "Wasserpotential"):

J_{CO2} [µmol m^{-2} s^{-1}] = ΔC_{CO2} [Pa/MPa] g_{CO2} [µmol m^{-2} s^{-1}],
wobei ΔC_{CO2} die Differenz des $C0_2$-Partialdrucks zwischen dem Ort der Assimilation (Chloroplasten) und der Atmosphäre darstellt (als treibende Kraft für die Diffusion) und g_{CO2} den Gesamt-Leitwert für CO_2.

J_{CO2} ist definitionsgemäß negativ, wenn die Pflanze $C0_2$ aus der Umgebungsluft aufnimmt ($C0_2$-Fluß aus der Atmosphäre in das Blatt), und positiv, wenn die Pflanze $C0_2$ an die Umgebung abgibt. Negatives J_{CO2} bedeutet demzufolge eine positive **Nettophotosyntheserate**. Da in der Pflanze auch im Licht ständig dissimilatorische Prozesse ablaufen, bei denen $C0_2$ freigesetzt wird, entspricht die gemessenen Nettophotosyntheserate nicht der jeweils stattfindenden photosynthetischen $C0_2$-Fixierung (**Bruttophotosyntheserate**). Messtechnisch lässt sich die Bruttophotosyntheserate ermitteln, indem man die Testpflanze verdunkelt (dann laufen nur noch die dissimilatorischen Prozesse), die $C0_2$-Abgabe bei Verdunkelung misst und sie zu der Netto-$C0_2$-Aufnahme im Licht addiert. Die Summe ergibt die Bruttophotosyntheserate.

C_3-Pflanzen verlieren einen Teil (bis 35 %) des photosynthetisch fixierten $C0_2$ sofort wieder durch die **Photorespiration** (Lichtatmung), die dadurch zustande kommt, dass die RubisCO sowohl als **Carboxylase** ($C0_2$-Bindung) als auch als **Oxygenase** (0_2-Bindung) fungiert. $C0_2$ und 0_2 konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle am Enzym; Veränderungen im Partialdruckverhältnis zwischen $C0_2$ und 0_2 verändern daher die Rate der Photorespiration. Messtechnisch lässt sich die Photorespiration ermitteln, indem der Pflanze 0_2-freie Luft angeboten wird. Bei **C_4-Pflanzen** ist die Photorespiration sowohl aufgrund der $C0_2$-Anreicherung in den Bündelscheidezellen als auch wegen der sofortigen Refixierung des entstehenden $C0_2$ durch die PEP-Carboxylase in den Mesophyllzellen unterdrückt.

Im Gegensatz zum Gaswechsel von Wasserdampf kommen beim $C0_2$-Gaswechsel weitere Widerstände (bzw. Leitwerte als deren. Kehrwerte) hinzu: Während für Wasserdampf angenommen werden kann, dass in den Atemhöhlen und dem Gasraum des Mesophylls (Interzellularräume) Wasserdampfsättigung herrscht (rF = 100 %) und somit kein nennenswerter Gradient zwischen den Zellen des Mesophylls und dem Gasraum besteht, muss $C0_2$, das über die Stomata in die Interzellularen gelangt ist, im Calvin-Cyclus über die RubisCO (bzw. bei C_4-Pflanzen über die PEP-Carboxylase als Vorfixierung) fixiert werden. Diese Fixierung erfolgt gegen einen Widerstand; die Summe der Widerstände für den Transport des $C0_2$ (und seine damit einhergehende Umwandlung in $HC0_3^-$) bis in die Chloroplasten und den dortigen "Fixierungswiderstand" bezeichnet man als **Mesophyllwiderstand**.

Die Bestimmung des Mesophyllwiderstands und des CO_2-Partialdrucks (und damit von ΔC_{CO2}) am Ort des Verbrauchs ist meßtechnisch schwierig (aber nicht unmöglich). Wesentlich einfacher (und

ökophysiologisch von großer Bedeutung) ist es, den Widerstand für den CO_2-Gaswechsel zwischen Atmosphäre und Interzellularräumen zu bestimmen. Dieser Widerstand (bzw. der Leitwert) ist nämlich proportional zu dem für Wasserdampf, es muss lediglich die unterschiedliche molare Diffusionsrate der beiden Gase berücksichtigt werden.

Dabei gilt: g_{CO2} [µmol m^{-2} s^{-1}] = g_{H20} [µmol m^{-2} s^{-1}] / 1.603.

4. Abgeleitete Größen

Mit Kenntnis der Leitwerts für $C0_2$ g_{CO2iz} für den Weg aus der Umgebungsluft bis in die Interzellularen und der $C0_2$-Gaswechselrate lässt sich der **$C0_2$-Partialdruck in den Interzellularen** (Symbol **c_i**) berechnen:

c_i [Pa/MPa] = c_a [Pa/MPa] – (J_{CO2} [µmol m^{-2} s^{-1}] / g_{CO2} [µmol m^{-2} s^{-1}])

C_3-Pflanzen halten durch entsprechende Bewegungen der Schließzellen über weite Bereiche verschiedener Umgebungsbedingungen ein c_i von ca. 65 - 70 % des c_a aufrecht,- bei den heute herrschenden c_a-Werten von ca. 360 Pa/MPa (das entspricht 360 µl/l oder 360 ppm) beträgt c_i dann um 240 Pa/MPa. C_4-Pflanzen besitzen einen effektiveren Mechanismus der $C0_2$-Bindung, daher sind sie nicht auf so hohe $C0_2$-Konzentrationen in den Interzellularen angewiesen. Ihre c_i-Werte liegen meist deutlich unter 200 Pa/MPa, in der Regel um 100 Pa/MPa. Das bedeutet gleichzeitig (bei angenommener gleicher Photosyntheserate J_{C02} wie eine C_3-Pflanze), dass der Leitwert g_{CO2} und damit auch der Leitwert g_{H20} viel kleiner sein kann und C_4-Pflanzen wesentlich ökonomischer mit Wasser umgehen können (s.u.).

Wie ökonomisch der Umgang mit Wasser ist, lässt sich am Verhältnis zwischen $C0_2$- und H_2O-Gaswechsel ablesen. Diesen Quotienten bezeichnet man als **Wassernutzungskoeffizient der Photosynthese WUE** (von engl. water use efficiency). Je mehr $C0_2$ pro transpirierter Wassermenge assimiliert werden kann, desto eher ist es möglich, trockene Standorte zu besiedeln. Es gilt:

WUE [µmol $mmol^{-1}$] = J_{CO2} [µmol m^{-2} s^{-1}] / E [mmol m^{-2} s^{-1}]

WUE wird von den kurzfristig gemessenen Gaswechselgrößen abgeleitet und unterliegt starken Schwankungen. Aussagekräftiger für einen längeren Zeitraum ist der Wassernutzungskoeffizient der Produktivität, der die gebildete Biomasse (= Produktion als Trockenmasse) in Beziehung setzt zur während dieses Zeitraums insgesamt verbrauchten Wassermenge:

$WUE_{Prod.}$ [g TS / kg H_20] Biomasseproduktion / Wasserverbrauch

Gruppe 4: CO_2-Gaswechsel von C_3- und C_4 -Arten

Die Versuche finden an Bohnen (*Phaseolus vulgaris* L.., C_3-Art) und Mais (*Zea mays* L., C_4-Art) statt, die während der Messungen verschiedenen Beleuchtungsstärken ausgesetzt werden, um die Lichtabhängigkeit des Gaswechsels- bei diesen grundlegend verschiedenen Photosynthesetypen zu erfassen.

Die Gruppe 4 führt zu diesem Themenbereich die folgenden Versuche durch:
a) Porometrische Gaswechselmessungen mit dem Li-COR 6200
b) Vergleich der Blattanatomie von C3- und C4 -Arten

Versuch a) Porometrische Gaswechselmessungen mit dem Li-COR 6200

Die Messungen des $C0_2$-Gaswechsels erfolgen **porometrisch**. Es steht ein Gerät der Fa. LICOR zur Verfügung (Porometer Typ 6200). Theorie und Handhabung des Geräts werden im Kurs detailliert erklärt. Es handelt sich um ein geschlossenes Gaswechselmesssystern, dessen grundsätzlicher Aufbau bei Steubing & Fangmeier, Versuch 121, beschrieben ist.

1. Kurzanleitung für Gaswechselmessungen mit dem Li-COR 6200

Diese Anleitung liefert einen kurzen Überblick, welche Vorbereitungen für die Messungen erforderlich sind, und wie eine Messung durchgeführt wird. Das ausführliche Studium der offiziellen Anleitungen der Firma LiCor kann durch diese Beschreibung nicht ersetzt werden.

Alle im folgenden Text *rot und kursiv* geschriebenen Begriffe werden am Ende der Anleitung etwas ausführlicher erläutert.

1 Hinweis: Wenn irgend möglich, sollten die folgenden Prozeduren an dem Ort stattfinden, an dem auch die Messungen erfolgen sollen.
1.1 Gerät einschalten (on/off-Schalter neben dem Display), dann Fan on, Pump on (beide Schalter rechts an der Konsole), Ventil hinten am Gerät auf CLOSE, Meßküvette schließen (geschlossener Modus liegt jetzt vor). Wenn rechts am Gerät bei READY das grüne Licht leuchtet, kann mit den nächsten Schritten begonnen werden.

2 Vor der Messung täglich durchführen:
2.1 *Zero the Flowmeter* - Flußmesser auf Null kalibrieren (*FCT* drücken, dann 48, return, return).
2.2 *Set Analyser Reference* - Infrarot Gasanalysator auf Temperatur kalibrieren (FCT 49, return, return).
2.3 Fmax - maximalen Fluß bestimmen (der durch die Trocknungseinheit geleitet werden kann): *MONITOR* drücken, Flow und CO_2 anzeigen lassen (FLOW drücken, dann mit den Pfeilen auf der Tastatur die obere Zeile des Displays nach unten bewegen; dann [CO_2] drücken; jetzt sollte in der oberen Zeile CO_2 und in der unteren der Flow angezeigt werden. Grund: auf dem Display wird immer die obere Zeile verändert, wenn eine neue Größe aufgerufen wird).
Geschlossener Modus (Kammer und Ventil hinten am Gerät müssen geschlossen sein).
DES ON (Kippschalter links auf der Konsole). Jetzt fließt ein Teil der Luft durch die Trocknungseinheit, die Ampulle mit dem Magnesiumperchlorat links am Gehäuse.
DES-Ventile ganz aufdrehen (Ventil direkt an der Trocknungseinheit und Ventil links auf der Konsole. Letzteres muß zum Öffnen im Uhrzeigersinn gedreht werden). Wenn der Flow-Wert nicht weiter ansteigt, Wert ablesen. Dann *DES OFF* und System öffnen (Ventil hinten am Gerät).

FCT 41 drücken, dann den abgelesenen Wert eingeben in Zeile: Fx/µmol. Dafür muß die Zeile oben im Display stehen. Dann EDIT drücken, dann Wert eingeben. Mit RETURN bestätigen. Nochmal RETURN, um wieder in den Monitor-Modus zu gelangen.

2.4 *CO_2-Analysator kalibrieren* (erst nachdem das grüne READY-Licht 10 Minuten geleuchtet hat). Relativ aufwendig. Siehe Seiten 4-18 bis 4-20 in der Anleitung (liegt im Kurs aus).

2.5 *Leak-Test* FCT 42 drücken. Folgende Einstellungen vornehmen: *Change* 60, *Channel* 10, *Obs* 5, *Step* 1. Wieder die zu ändernde Zeile im Display nach oben bringen, EDIT drücken, dann neue Zahl eintippen und RETURN drücken. Nach letzter erfolgter Änderung ein zweites Mal RETURN drücken, um in den Monitor-Modus zu gelangen.
Im Monitor-Modus CO_2 und Flow anzeigen lassen (wie unter Punkt 2.3 beschrieben), System schließen (Ventil hinten am Gerät) und DES ON. Fluß auf 500 einstellen (Ventil links auf der Konsole gegen den Uhrzeigersinn drehen, bis Flow auf Display 500 anzeigt). Dann DES OFF und Ventil an Geräterückseite öffnen. *LOG* drücken (= Messung der CO_2-Außenkonzentration). Nach 60 Sekunden wird ein Wert angezeigt (das Gerät piepst einmal). VIEW drücken, CO_2-Wert notieren (den Wert bei 1M, nicht 1R; ist die CO_2-Außenkonzentration = $CO_{2außen}$). Wenn Flow-Wert auf dem Display angezeigt werden sollte, [CO_2] drücken, dann Wert notieren. MONITOR drücken (es müssen wieder CO_2 und Flow angezeigt werden (siehe Punkt 2.3). Das System schließen, DES ON und *SCRUB ON* (Jetzt fließt die gesamte Luft auch durch die Ampulle mit dem "Sodalime" = Natronkalk, links am Gehäuse, neben der Ampulle mit dem Magnesiumperchlorat. Das Sodalime bindet das CO_2 aus der Luft). Warten bis CO_2 nahe null ist. Dann *SCRUB OFF*, warten bis CO_2 langsam und kontinuierlich steigt (Anfangssprünge dürfen nicht erfaßt werden; eventuell nochmals SCRUB ON). LOG drücken (Messung dauert fünf Minuten). Wenn Messung vorbei (zweimaliges piepsen) und auf dem Display nicht mehr "computing" steht, *VIEW* drücken. DES OFF und Ventil hinten am Gerät öffnen. Vom CO_2 Wert 5M notieren, dies ist der CO_2-Mittelwert in der Kammer bei der letzten, fünften Messung (=$CO_{2Kammer}$). FCT 1A drücken. Wieder 5M notieren, ist die zeitliche Veränderung des CO_2 (dCO_2/dt).
τ muß berechnet werden.
$\tau = (CO_{2außen} - CO_{2Kammer})/dCO_2/dt$

FCT 41 aufrufen. Display mit Pfeilen nach unten bewegen. Unter A8 $CO_{2außen}$ und unter A9 τ eingeben (wieder zu ändernde Zeile nach oben bringen und EDIT drücken, dann den neuen Wert eingeben und RETURN drücken.; um wieder in Monitor-Modus zu gelangen nach Änderung A9 ein zweites mal RETURN drücken).
Die Meßwerte werden nun vom Gerät automatisch um die Leckrate des Systems korrigiert.
τ sollte zwischen 5000 und 20000 liegen. Wenn der Wert kleiner als 5000 ist, müssen die Kammerabdichtungen ausgetauscht werden und der gesamte Leak-Test ist zu wiederholen.

2.6 *K-Test* FCT 42 aufrufen. Folgende Einstellungen vornehmen: Change 10, Channel 10, Obs 2, Steps 1 (wieder: zu ändernde Zeile nach oben bringen, usw., siehe oben).
MONITOR drücken. FLOW anzeigen lassen. System schließen (Ventil an Geräterückseite) und DES ON. Flow auf 150 einstellen (Ventil links auf Gehäuse gegen Uhrzeigersinn drehen; dann Ventil direkt an der Trocknungseinheit schließen, bis im Display bei Flow 150 steht). DES OFF und System öffnen. FCT 18 drücken. Die zeigt den Wasserdampfdruck der Luft an. Warten bis der sich nicht mehr verändert.
Das System schließen und DES ON. Wenn der Wert sinkt, LOG drücken. Am Ende der Messung (das Gerät piepst zweimal und auf dem Display erscheint "computing") das System öffnen und DES OFF. FCT 24 wählen. Die zwei K-Werte notieren. Dann die Messung wiederholen: FCT 18, wenn Wert gleichbleibend, das System schließen, DES ON, LOG.

Unter FCT 41 den K-Wert als Mittelwert (wenn er zwischen 1,0 und 1,5 liegt) aus den vier notierten eingeben (in der Zeile Kabs). Die Messungen wiederholen und gegebenenfalls das *Trocknungsmittel* tauschen, wenn der Wert nicht im erwünschten Bereich liegt. (Hinweis: Wenn am Vortag viel gemessen wurde oder wenn das Gerät lange unbenutzt war, kann das Trocknungsmittel ganz am Anfang ausgetauscht werden, da dann mit Sicherheit dessen Qualität schlecht ist.)

2.7 *Soda-Lime-Test* (alle zwei bis vier Wochen durchführen):
SCRUB ON, DES OFF (beide links auf der Konsole), RESPONSE 1, PUMP ON (beide rechts auf der Konsole). Meßküvette öffnen, deren Ventilator ausschalten. Im Display CO_2 anzeigen lassen (MONITOR drücken, dann [CO_2]. Wenn Anzeige stabil (sollte nahe null sein), in Küvette atmen, diese dann schließen. Jetzt Küvetten-Ventilator einschalten. Angezeigter CO_2-Wert sollte gleich bleiben (im Bereich von 50 ppm). Wenn CO_2 stärker steigt, Sodalime ersetzen.

2.8 Bestimmung der *Boundary Layer Conductance* (siehe im Praktikum ausliegende Anleitung, Seite 5-3). Täglich durchführen.

Alle Punkte bis hierher wurden am Morgen vor Kursbeginn durchgeführt, da sie ziemlich zeitaufwendig sind.

3 Messungen durchführen: (Mit diesem Punkt beginnt der Kurs).

3.1 FCT 42 wählen. Folgende Einstellungen vornehmen: Change 4 (2 bei wenig Licht, Wasser- oder anderem Extremstress), Channel 15, Obs 4, Steps 1. Return drücken.
3.2 Pflanzendaten eingeben: Dafür *AUX* drücken, neuen Namen/Kennziffer, persönlichen Code (wie es gefällt) eingeben.
3.3 Blatt einspannen, Blattfläche eingeben: Dafür *AREA* drücken. Der *Area multiplier* (=Area mult bei FCT 42) enthält den Wert für die Kammerbreite (3,35 cm). Bei Blättern, die gleich breit sind im Kammerbereich, muß nun unter AREA der Mittelwert für die Blattbreite eingegeben werden. Das Gerät multipliziert dann mit 3,35 und die korrekte Blattfläche ist im System. Bei Blättern die anders geformt sind, kann 1 in den Area multiplier (FCT 42, Area mult) eingegeben werden. Dann muß die Blattfläche ermittelt und eingegeben werden.
3.4 MONITOR drücken. CO_2 und relative Luftfeuchte (RH = relative humidity) anzeigen lassen (gleiche Prozedur wie unter 2.3 beschrieben).
System schließen und DES ON. Mittels Fluß eine konstante Luftfeuchte einregulieren. Das System öffnen und wieder schließen, um zu prüfen, ob RH gut eingestellt ist.
3.5 System öffnen. Bei stabilem CO_2 Signal System schließen und DES ON. Wenn CO_2 langsam und kontinuierlich fällt (wichtig: große Sprünge am Anfang noch nicht messen) mit LOG die Messung starten. Jetzt keine Veränderungen am System vornehmen.
Wenn die Messung beendet ist, VIEW drücken und die Werte anschauen. Vernünftige Ergebnisse abspeichern (*STORE*) bzw. notieren.

WICHTIG: Abends im Labor die Batterien aufladen.
Falsche Eingaben im Display löschen (z.B. falsch eingegebene Pflanzendaten): Gleichzeitig die Tasten "SHIFT" und "K" drücken.

AREA. Hier die bestimmte Blattfläche eingeben, dabei aber auch den *Area multiplier* beachten.

Area multiplier. Wann immer unter *AREA* eine Zahl eingegeben wird, wird diese mit dem Wert des Area multipliers multipliziert. Wenn "rechteckig" geformte Blätter in die Meßküvette eingespannt werden, kann die Kammerbreite (3,35 cm) als Area multiplier eingegeben werden. Dann muß nur

noch die Breite des Blattes in der Kammer gemessen werden und unter *AREA* eingegeben werden. Bei Blättern anderer Form ist es sinnvoll, für den Area multiplier 1 anzugeben.

AUX. Hier wird eine eindeutige Kennzeichnung der Probe einprogrammiert, wenn die Daten nicht direkt, sondern am PC ausgelesen werden.

Boundary layer conductance. Sehr komplexes Thema. Siehe Anleitung der Firma LiCor (liegt im Kurs aus).

Change. Eine Änderung um die eingegebene Zahl muß erreicht werden, um eine Messung zu beenden. Der *Channel* bestimmt dann, um welche Größe (Zeit, CO_2-Konzentration, etc.) es sich handelt. (**Beispiel**: Change=4. Bedeutet bei *Channel* 10, eine Messung dauert 4 Sekunden und bedeutet bei *Channel* 15, daß eine Messung beendet ist, wenn sich im System die CO_2-Konzentration um 4 ppm verändert hat.)

Channel. Jedem Channel ist eine bestimmte Größe zugeordnet. (**Beipiel**: Channel 10 ist die Zeit, Channel 15 ist die CO_2-Konzentration.) Wenn nun der Channel=10 ist, und der *Change*=5, würde eine Messung nach 5 Sekunden beendet. Wäre der Channel=15 und der *Change*=5, würde die Messung beendet, wenn die CO_2-Konzentration im System sich um 5 ppm verändert hat.

CO_2-Analysator kalibrieren. Grund: CO_2-freie Luft und eine bekannte CO_2-Konzentration werden gemessen, dann beide Werte gespeichert. Dies garantiert, daß immer die tatsächlich gemessenen CO_2-Konzentrationen der Luft angegeben werden. Ist wichtig, falls versehentlich die Stellknöpfe betätigt wurden. Näheres in der LiCor-Anleitung, Seiten 4-18 bis 4-20.

DES ON/DES OFF: Nur wenn der Schalter links auf der Konsole auf Des on steht, fließt ein Teil des Luftstromes durch das Trocknungsmittel, um Wasser zu entziehen und somit die Luftfeuchte im System konstant zu halten.

DES-Ventile. Das eine Ventil befindet sich direkt an der Ampulle mit dem *Trocknungsmittel*. Das andere Ventil ist links auf der Konsole (mit DES FLOW bezeichnet). Letzteres muß gegen den Uhrzeigersinn gedreht werden, um es zu öffnen.

FCT. Die Function-Taste erlaubt es, Parameter abzulesen, denen keine spezielle Taste zugeordnet ist. FCT 25 liefert z.B. die Werte für die Transpiration.

K-Test. Grund: Der K-Test quantifiziert die Effekte der Wasserdampfabsorption und dient dem allgemeinen Systemcheck. Der Test zeigt Probleme auf wie eine feuchte Trocknungseinheit, Schmutz im System oder auch eine noch nicht erfolgte Anpassung an die Außenbedingungen. Anhand dieses Testes entscheidet sich, ob ein Austausch des *Trocknungsmittels* erforderlich ist.

Leak-Test. Grund: In dem geschlossenen Meßsystem verringert sich die CO_2-Konzentration, da das eingespannte Blatt Photosynthese betreibt. Wenn das System nicht absolut dicht ist, was aufgrund des Vorhandenseins zahlreicher Dichtungen zu erwarten ist, wird CO_2 durch die Lecks in das System einströmen, da im System die Konzentration während der Messung sinkt. Dieses nachströmende CO_2 würde dazu führen, daß eine zu geringe Photosyntheserate angezeigt wird. Der Test ermittelt die Leckrate und erlaubt so eine Korrektur der gemessenen Werte.

LOG. Eine Messung wird gestartet.

MONITOR. Die Monitor-Taste erlaubt es, direkt, also auch während einer Messung, den aktuellen Wert eines gewünschten Parameters zu beobachten. Beispiel: Monitor drücken. Dann RH drücken. Jetzt ist in der oberen Zeile des Display die aktuelle relative Luftfeuchte (=RH; englisch für relative Humidity) zu sehen.

Obs. Gibt an, wieviel Messungen auf einer Seite gespeichert werden. Wäre Obs=3, würde beispielsweise dreimal die Messung durchgeführt. (**Beispiel**: *Change*=4, *Channel*=15, Obs=3. Das heißt, es werden 3 Messungen durchgeführt, die jeweils eine Änderung der CO_2-Konzentration um 4 ppm beinhalten.)

SCRUB ON/SCRUB OFF. Wenn der Schalter links an der Konsole auf Scrub on steht, fließt der Luftstrom durch das in der Ampulle enthaltene Sodalime (Natronkalk), welches der Luft CO_2 entzieht. Wird für den *Leak-Test* benötigt.

Set analyser reference. Grund: Dem Computer wird mitgeteilt, welche Gaskonzentration in der Referenzseite des Infrarotgasanalysators herrscht. Sollte null sein.

Soda-Lime-Test. Grund: Testet das Sodalime im linken Gefäß. Das wird benutzt, um den Analysator auf null zu setzen. Das rechte Gefäß hält die Referenzseite des Analysators CO_2-frei. Wenn das Sodalime ersetzt werden muß (wenn nach ausatmen in die Kammer die CO_2-Konzentration um mehr als 50 ppm ansteigt), das linke Gefäß neu befüllen und dann rechts anbringen, daß Gefäß von rechts links anschließen.

Step. Ist der Intervall zwischen den Messungen. LiCor gibt an, hier immer eins einzugeben.

STORE. Mit dieser Taste können Ergebnisse gespeichert werden, nachdem *VIEW* gedrückt wurde und nachdem die Werte kurz auf Plausibilität geprüft wurden.

Trocknungsmittel. Hierfür dient Magnesiumperchlorat, welches Wasser absorbiert.

VIEW. Muß nach Beendigung einer Messung betätigt werden. Der Computer arbeitet die gemessenen Daten auf und stellt sie in den Zwischenspeicher.

Zero the Flowmeter. Grund: Dem Computer wird mitgeteilt, welches Voltsignal der Flußmesser abgibt, selbst wenn gar kein Fluß herrscht. Es wird praktisch ein elektrisches Grundrauschen quantifiziert.

2. Aufgabenstellung

Bitte erstellen sie eine Lichtsättigungskurve von jeweils einer Pflanze des C3- und C4 – Stoffwechseltyps. Bestimmen Sie bei Lichtsättigung Nettosphotosynthese, stomtärer Widerstand, stomatäre Leitfähigkeit, Wassernutzungseffizienz der Photosynthese, interner (Ci) und atmosphärischer (Ca) CO2-Partialdruck, Ci/Ca-Verhältnis und Transpiration. Welche Aussagen lassen sich zum Thema C3 und C4 Stoffwechsel aufgrund der Ergebnisse ableiten ?

Versuch b) Vergleich der Blattanatomie von C_3- und C_4-Arten

Im zweiten Teil des Experiments (s.o. Versuch a) untersuchen wir den anatomischen Bau der Laubblätter. Unter Einsatz einer speziellen Schneidetechnik ist es leicht möglich, Blattquerschnitte zu erhalten (Abb. 4). Hierzu werden schmale Blattstücke auf einem Objektträger unter ein Deckglas

gelegt. Mit einer halbierten Rasierklinge schneiden wir nun rasch eine Serie dünner Querscheibchen ab. Die wurmförmigen Schnitte werden in einen Tropfen Wasser überführt, mit einem Deckglas abgedeckt und im Lichtmikroskop betrachtet. An einigen Stellen sind die Präparate im Querschnitt zu beobachten. Wir zeichnen je einen Blattquerschnitt (siehe Abbildung 5). Das Blatt der C3-Pflanze besteht aus der Epidermis (mit Stomata), den Leitbündeln und dem grünen, photosynthetisch aktiven Mesophyll (= 1 Zelltyp). Der Bau des C4-Blattes ist komplizierter (Kranzanatomie), die Leitbündel sind von einer Schicht relativ großer, blasenförmiger Zellen umschlossen (Leitbündelscheide). Durch biochemische Kooperation der Mesophyll- und Bündelscheidenzellen (= 2 Zelltypen) wird eine Akkumulation an CO_2 -Molekülen im inneren Zellkranz erreicht und somit die O_2-abhängige Photorespiration unterdrückt.

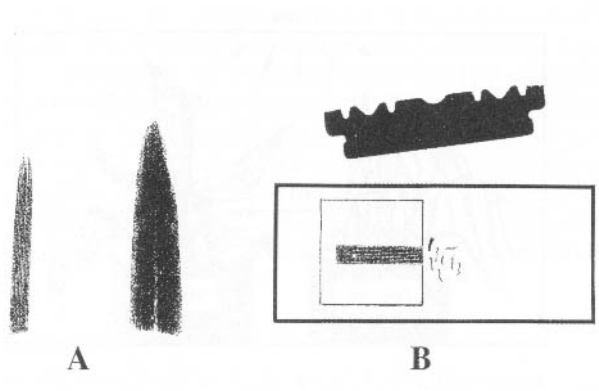


Abb.4: Methode zur Gewinnung von Blattquerschnitten. Spitzen der Blätter von C3- und C4-Pflanzen (Gerste, Mais) (A). Ein etwa 5 mm breites Blattsegment wird unter ein Deckglas geklemmt und mit einer halbierten Rasierklinge zerschnitten (B).

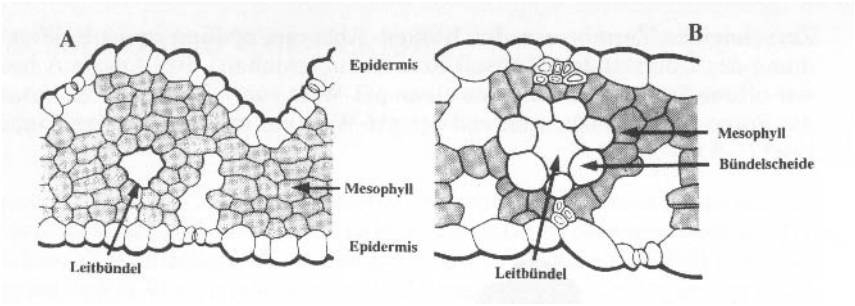


Abb.5:: Querschnitte durch die Blätter von C3- und C4-Pflanzen (A, Gerste) (B, M;

Mesophyll- und Bündelscheidenzellen bilden die Grundlage der „Kranzanatomie" des Laubblattes der Maispflanze. (Nach LICHTENTHALER, H. & PFISTER, K.: Praktikum der Photosynthese Quelle & Meyer, Heidelberg, 1978.)

Gruppe 5: Transpiration der Pflanzen

Die Gruppe 5 führt zu diesem Themenbereich die folgenden Versuche durch:

a) Porometrische Bestimmung der Transpiration mit dem LI-1600
b) Morphologie und Physiologie der Stomata (Pflanzenmaterial von Versuch a)
c) Messung des Randfeldeffekts

Versuch a) Porometrische Bestimmung der Transpiration mit dem LI-1600

Versuchsmaterial und Fragestellung

Es soll im Gewächshaus die Transpiration an Halophytenblättern bestimmt werden. Halophyten sind salztolerante Pflanzen die z.B. im Meerwasser vorkommen. Die Bodensalinität bewirkt eine Abnahme des Wasserpotentials. Im Gewächshaus stehen 5 gleiche Kulturen die sich nur durch den Salzgehalt im Boden unterscheiden. Bitte erstellen sie Diagramme aus denen der Einfluss von Salinität zu Transpiration (Versuch a), stomatärer Widerstand und Einzelblattfläche (Haben Sie eine Idee wie man die Einzelblattfläche bestimmen könnte ?) hervorgeht.

Die Wasserdampfabgabe der Blätter wird mit Hilfe des Transpirationsmeßgerätes (DT Devices MK3) bestimmt (Versuch a). Es werden jeweils mindestens 3 Wiederholungsmessungen je Ansatz durchgeführt. Als Grundlage für die Messung dient die bei der Transpiration entstehende "Verdunstungskälte". Die relative Temperaturänderung an einer transpirierenden Blattoberfläche pro Zeiteinheit ist ein Maß für den stomatären Widerstand Rs mit der Dimension s/cm.

Kurzanleitung für das LiCor LI-1600 Steady State Porometer

1) Akklimatisierung des Gerätes an die Umgebungsbedingungen

Gerät und Meßkopf verbinden. "Null-Gain-Adjust"-Ventil schließen (Knopf im Uhrzeigersinn drehen). Gerät einschalten. 1-2 Minuten warten.

2) Nullpunkt einstellen auf Umgebungsluftfeuchte:

"Null-Gain-Adjust"-Ventil bleibt geschlossen. Schalter "HUM SET" am Meßkopf eine Sekunde drücken. Display zeigt aktuelle Luftfeuchte. "Null-Adjust"-Anzeige zentriert sich. (Diese Prozedur muß einmal vor der ersten Messung erfolgen und dann nur wiederholt werden, wenn das Gerät ausgeschaltet war.)

3) Erhalten des steady state:

Blatt in Meßkopf einspannen. "Null-Adjust"-Anzeige beobachten. Drei Möglichkeiten:

● Nadel ist in der Mitte: Perfekt. Weiter bei Punkt vier.

● Nadel ist weit links: Feuchte ist unter Nullpunkt. "Null-Gain-Adjust"-Ventil schließen (Knopf im Uhrzeigersinn drehen), damit weniger trockene Luft in Küvette strömt. Nadel nähert sich der Mitte. Dann weiter bei Punkt vier.

● Die Nadel ist weit rechts: Feuchte ist über Nullpunkt. "Null-Gain-Adjust"-Ventil öffnen (Knopf gegen den Uhrzeigersinn drehen), damit mehr trockene Luft in Küvette strömt. Nadel nähert sich der Mitte. Dann weiter bei Punkt vier.

Wenn Nadel in der Mitte steht, ist "steady state" bei Nullpunkt-Feuchte (Umgebungsfeuchte) erreicht.

4) Meßwerte ablesen:

Wenn "steady state" erreicht ist, können Meßwerte abgelesen werden. Am Meßkopf Schalter "HOLD" betätigen. Blatt aus Meßkopf lösen. Dann die einzelnen Parameter ablesen.

5) Nächste Messung:

Bei Punkt drei beginnen. Nicht vergessen, den Schalter "HOLD" auszuschalten.

Einige allgemeine Anmerkungen:

- Die Pflanzen nicht mit dem Körper beschatten.
- Das "Null-Gain-Adjust"-Ventil nur sanft zudrehen, da sonst eine Beschädigung möglich ist.
- Rel. Hum. (=relative humidity) sollte im Bereich von 20 bis 80 % liegen, da ansonsten Ungenauigkeiten bei der Messung sehr groß werden.
- Bei Nichtbenutzen das Gerät nicht in der Sonne lagern.
- Es gilt absolutes Rauchverbot in der Nähe des Gerätes.

Versuch b) Morphologie und Physiologie der Stomata

Untersucht werden zunächst die Einflüsse der Kulturbedingungen (Salinität) auf die Transpiration (siehe Versuch a). Morphometrische Daten zur Anzahl, Länge und Breite der Stomata sollen die physiologischen Daten ergänzen bzw. erklärbar machen. Untersucht werden jeweils mindestens drei unterschiedlich alte Flachblätter der vorkultivierten Pflanzen:

Morphometrische Daten: Messungen an Spaltöffnungen

Ein Stückchen Blatt-Epidermis, etwa 5X5 mm groß, wird abgezogen oder 1-2 Flächenschnitte werden mit einer Rasierklinge hergestellt. Das Präparat wird dann schnell in einem Tropfen Paraffinöl auf einem Objektträger eingeschlossen und mit einem Deckglas abgedeckt. Von der Ober- und Unterseite eines Blattes je ein Präparat herstellen. Die Cuticula muß auf dem Objektträger liegen.
Bereitet das Schneiden Schwierigkeiten, kann man alternativ das Abdruckverfahren benutzen. Dazu nimmt man etwas Klebstoff (Uhu), bestreicht damit die Blattfläche, läßt den Kleber antrocknen und zieht dann vorsichtig mit einer Pinzette den Kleber mit den darauf abgedruckten Spaltöffnungen wieder ab und mikroskopiert diesen Abdruck.

Aufgaben:

a) Es wird die Länge und die größte Breite des Spaltes von wenigstens 10 Spaltöffnungen mit dem Strich-Okularmikrometer bestimmt (Messungen mit dem Objektiv 1:45).
b) Mit dem Netz-Okularmikrometer wird die Anzahl der Spalten, die sich auf 1 mm2 Blattoberfläche befinden, bestimmt (Messung mit dem Objektiv 1:10).
c) Wenn mindestens 10 Einzelwerte bestimmt wurden (Länge und Breite getrennt), kann die Standardabweichung berechnet werden.

Auswertung:

1. Fassen Sie die gemessenen morphologischen Daten und die Rs-Werte (Mittelwerte und Standardabweichungen aus n= 10 bzw.n=5) in Abhängigkeit von den jeweiligen Versuchsbedingungen in einer Tabelle zusammen.
2. Erläutern Sie die Einflüsse der unterschiedlichen Kulturbedingungen auf die blattmorphologischen Daten und die Transpiration.

Versuch c) Modellversuch zur Transpiration

Die physikalischen Eigenschaften der Transpiration lassen sich leicht an Modellversuchen demonstrieren. Zunächst ist die Größe der transpirierenden Fläche von Bedeutung (Verdunstungsexponent). Daneben spielt der Umfang der Fläche eine wesentliche Rolle. Die Ränder einer verdunstenden Fläche geben leichter Wasser ab als zentrale Bereiche (Randfeldaktivität, Porenverdunstung).
Der Verdunstungsexponent gibt an in welcher Weise die Verdunstung mit wachsendem Radius einer Fläche zunimmt.

$$n = \frac{\log V1 - \log V2}{\log rl - \log r2}$$

n Verdunstungsexponent

V1(2) und rl (2) Verdunstung und Radius einer Kreisscheibe 1 (2)

Kreisscheiben (r= 3.0, 4.15, 5.15 und 6.0 cm) werden aus Papier ausgeschnitten und mit Wasser getränkt. Nach der Wägung werden die Kreisscheiben an einem windstillen Ort aufgehängt. Nach 15 min ist erneut zu wiegen (2 x reproduzieren und mitteln).

Auswertung: In einer Tabelle sind Fläche (cm2), Verdunstung (g/h) Verdunstungsverhältnis und Verdunstungsexponent anzugeben.

Gruppe 6: Indikation von Pflanzenstress und Adaptation an extreme Standorte

Die Gruppe 6 führt zu diesem Themenbereich die folgenden Versuche durch:

a) Leitfähigkeitstest zur Erfassung der Membranintegrität
b) Chlorophyllfluoreszenzmessung mit dem SPAD (Minolta)
c) Fluoreszenz von Chlorophyll in Lösung
d) Dünnschichtchromatographische Trennung der Chloroplastenfarbstoffe
e) Fluoreszenz von Chlorophyll in Lösung

Versuchsmaterial und Fragestellung
Die Versuche a) und b) Es soll an Gewächshausmaterial (Halophytenblättern) durchgeführt werden. Halophyten sind salztolerante Pflanzen die z.B. im Meerwasser vorkommen. Die Bodensalinität bewirkt eine Abnahme des Wasserpotentials. Im Gewächshaus stehen 5 gleiche Kulturen die sich nur durch den Salzgehalt im Boden unterscheiden. Bitte erstellen sie Diagramme aus denen der Einfluss von Salinität auf die Membranintegrität (Versuch a) und die Chlorophyllfluoreszenz hervorgeht.

Versuch a) Leitfähigkeitstest zur Erfassung der Membrantoxizität

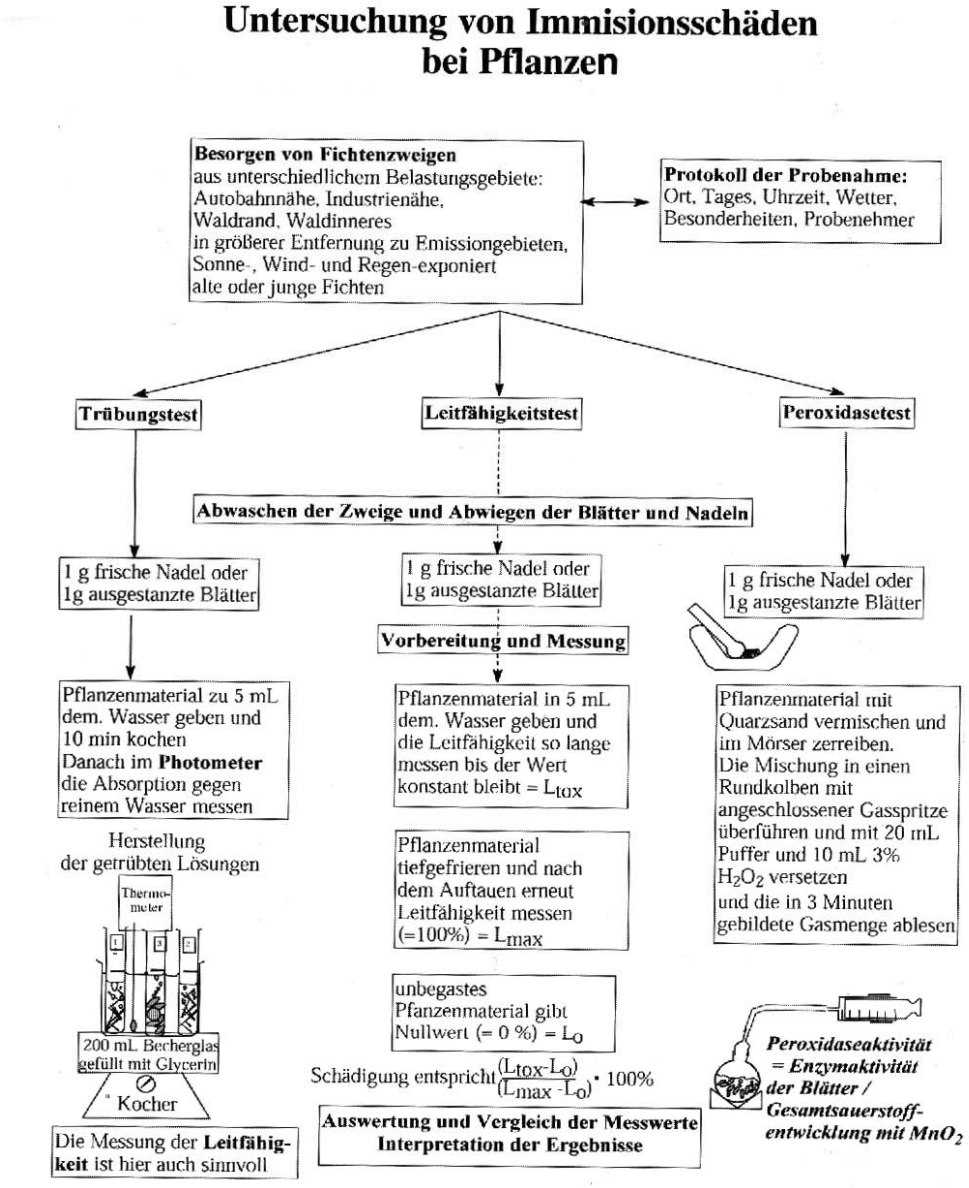
Theorie
Manche Stoffe vermögen Zellmembranen so zu schädigen dass der Zellinhalt ausläuft. Bei Pflanzen sind die Zellen des Blattes noch von einer Epidermis umgeben, der noch wachsartige Kutikula-Schichten aufliegen, welche jedoch den auslaufenden Zellsaft auch nicht aufhalten

können. Dieser Zellsaft enthält Salze, welche in der wässrigen Lösung den elektrischen Strom leiten. Laufen mehrere Zellen im reinen Wasser aus, kann aus der Zunahme der Leitfähigkeit des Wassers auf die Membrantoxizität geschlossen werden. Da jede Messung einen Vergleich mit bekannten Größen ermöglicht, muss ein Null- und ein Maximalwert festgelegt werden. Den Nullwert aus dem Leitwert von ungeschädigtem Blatt und den Maximalwert erhält man durch völlige Zerstörung der Zellmembranen. Letzteres erreicht man durch Einfrieren des Blattes, wobei die Eiskristalle mechanisch die Zellmembranen durchstoßen.

1. Messung des ungeschädigten Blattes = 0% Schädigung (Nullwert)
2. Messung des maximal geschädigten Blattes = 100% Schädigung (Maximalwert)
3. Messung des geschädigten Blattes

Die Messung kann auch zur Erfassung der Schädigung von Pflanzen durch Luftschadstoffe benutzt werden (~ *Biomonitoring*, siehe auch die nachfolgende Abbildung *).*

Der Leitfähigkeitstest ist einer von drei einfachen Untersuchungsmethoden, die mit wenig Aufwand und in einem Feldlabor durchgeführt werden können (siehe Abbildung).



Versuchsmaterial und Fragestellung

Es soll die Membranintegrität von Halophyten aus dem Gewächshaus bestimmt werden. Halophyten sind salztolerante Pflanzen die z.B. im Meerwasser vorkommen. Die Bodensalinität bewirkt eine Abnahme des Matrixpotentials. Im Gewächshaus stehen 5 gleiche Kulturen die sich nur durch den Salzgehalt im Boden unterscheiden. Es ist wichtig das alle Pflanzen ansonsten unter gleichen Bedingungen wie gleiche Versorgung mit Licht, Luftfeuchtigkeit und Wasser kultiviert wurden. Auch die Bodenart (Sand, Ton..) der Säuregehalt im Boden, die Wasserdurchlässigkeit des Bodens usw. müssen vergleichbar sein.

Geräte und Chemikalien:

Leiffähigkeitsmessgerät mit Messfühler, Thermometer, da die Leitfähigkeit sich mit der Temperatur ändert, 200 mL Becherglas, Korkbohrer mit größtem Durchmesser, demineralisiertes (dem.) Wasser, Uhr.

Vorschrift:

1. *Nuliwert*

Satt mit dem. Wasser kurz abspülen, um oberflächlich anhaftende Salze zu entfernen. Mit zwei Blättern überprüfen, in wieweit dieses Abspülen die Messung beeinflusst! (Bei einem abgespülten und einem nicht abgespülten Blatt die Leitfähigkeit nach Einbringen der Blätter in zwei Gefäße mit dem. Wasser messen).

Ein Blattstück mit dem Korkbohrer ausstanzen und dieses sofort in 100 mL dem. Wasser geben. Die Leitfähigkeit der Lösung messen. wobei durch vorsichtiges Umrühren sichergestellt wird, dass sich das aus der Zelle ausfließende Salz gleichmäßig im Wasser vor teilt. Gültig ist der Messwert, welcher sich nicht mehr wo wesentlich ändert. Falls der Messwert ständig zunimmt und auch nach 20 Minuten der Wert nicht konstant bleibt, muss ein bestimmter Zeitpunkt für die Messwert-erfassung festgelegt werden. So könnten in diesem Fall alle Messungen nach 5 Minuten erfolgen (L_0).

2. Maximalwert = 100 %

Das Blattstück mit dem Wasser aus Versuch 1 wird in ein Kunststoffgefäß gegossen und im Tiefkühlschrank gefroren. Nach dem Auftauen wird erneut die Leitfähigkeit (Lmax) gemessen.

3. Die Leitfähigkeit des geschädigten Blattes wird analog der Bestimmung des Null-Wertes gemessen (Ltox).

Der Messwert wird zwischen dem Nuliwert und dem Maximalwert eingeordnet und als relative Leiffähigkeit in Prozent angegeben:

$$\text{relative Leitfähigkeit} = (L_{tox} - L_0) / (L_{max} - L_0) * 100\ \%$$

Da alle Messungen Schwankungen unterworfen sind, muss die Messung der Leitfähigkeit von geschädigten Blattstücken noch zwei Mal wiederholt und aus diesen drei Messungen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet werden.

Versuch b) Chlorophyllfluoreszenzmessung

Abb. 5.1: Hydro N-Tester

Messprinzip
Der Hydro N-Tester wird zur Ermittlung des N-Düngebedarfes zur Nachdüngung zum Schossen und Ährenschieben (2. und 3. N-Gabe, EC 30 bis EC 51) bei Winterweizen, Wintergerste, Winterroggen und Triticale eingesetzt. Hierbei wird im wachsenden Bestand der Chlorophyllgehalt des jeweils jüngsten, vollentwickelten Blattes mit Hilfe des handlichen Hydro N-Testers optisch gemessen. Mit Hilfe des N-Testers ist es möglich, den N-Ernährungszustand von Pflanzen ohne Einsatz von Chemikalien oder sonstigen Hilfsmitteln vor Ort zu messen. Bereits nach wenigen Minuten kann eine schlagspezifische Düngungsempfehlung abgeleitet werden. Dabei setzt die Anwendung des N-Testers keine Vorkenntnisse voraus und ist so einfach wie die Bedienung eines Taschenrechners.

Einflussfaktoren
Keinen Einfluss auf den Messwert haben folgende Faktoren: Tageszeitpunkt, Spritzbeläge von PS-Mitteln, feuchte Blätter (Niederschlag, Tau) und Ertragsniveau. Einen Einfluss auf den Messwert haben neben der Sorte: Wasserstress (Einrollen der Blätter), Salzstress und Schwefelmangel.
Generell gilt, dass der Messwert den momentanen N-Ernährungszustand widerspiegelt, d.h. die zukünftige N-Versorgung aus dem Boden kann nicht vorhergesagt werden. In Extremsituationen, wie z.B. lang anhaltender Trockenheit werden aufgrund der eingeschränkten N-Aufnahme evtl. vorhandene hohe Nmin-Vorräte durch die Messung nicht erfasst. Deshalb muss Ihre Erfahrung bei der Interpretation des N-Tester-Meßwertes mit einfließen. Die Überprüfung des Gerätes in Feldversuchen und Praxiseinsätzen auch der Offizialberatung hat gezeigt, dass mit dieser Methode eine sehr hohe Treffsicherheit hinsichtlich der notwendigen optimalen Düngergabe erreicht wird.

Kurzanleitung für das Minolta Chlorophyll Meter SPAD-502 (Fluoreszenzmessgerät)

Vorbereitung der Messapparatur:

1) Anschalten des Messgeräts (On)
2) Kalibrieren (CAL) des Messgeräts durch Verschliessen des Messkopfs (ohne Blatt). In der Anzeige steht CAL.
3) Nach Beendigung der Kalibrierung können Messungen am Blatt ausgeführt werden. In der Anzeige wird die Messanzahl protokolliert (N=0,1,2.....). Die Messung erfolgt nach dem Einlegen des Blatts durch Zusammenpressen des Messkopfs. Bis zu 30 Daten können (und sollen je Blatt) so automatisch gespeichert werden. Es können der Mittelwert und die Standardabweichung abgerufen werden.
4) Die Daten können durch Betätigen der Taste CLEAR gelöscht werden. Das Gerät steht nach Betätigung dieser Taste direkt für eine neue Messreihe zur Verfügung.

Aufgabenstellung
Verwenden sie das gleiche Versuchsmaterial wie bei Versuch a). Messen sie jeweils 10 gleichalte Blätter (das jüngste vollentwickelte) von allen Salinitätsstufen. Welche Unterschiede bewirkt der sie Salinität ? b) Führen sie Messungen an beliebigem, möglichst nekrotischem Pflanzenmaterial aus. Welche Auswirkung haben die Blattschäden auf die Messwerte ?

Versuch c) Extraktion von Blattpigmenten für die Versuche d und e)

Zeitaufwand: Vorbereitung: 5 min, Durchführung: 15 min
Material: Verwenden Sie das gleiche Versuchsmaterial wie bei a) und b). Es können auch grüne Blätter der Bohne (Phaseolus vulgaris), Erbse (Pisum sativum), Brennnessel (Urtica dioica) oder von anderen Pflanzen genommen werden.
Geräte: Reibschale und Pistill, Messzylinder (100 mL), Glastrichter, Faltenfilter, Erlenmeyerkolben (100 mL), Becherglas (100 mL), Spatel, Alufolie, Wasserbad, Abzug, Waage, Schere, evtl. Scheidetrichter (200 mL), Becherglas (200 mL), Messkolben (50 mL)
Chemikalien: Methanol, 96 %iges Ethanol, Aceton, Seesand, Calciumcarbonat ($CaCO_3$), evtl. Petroleumbenzin (Siedebereich 50-70 °C), Aqua dest. ,Natriumchlorid (NaCl), Dinatriumsulfat (Na_2SO_4 wasserfrei)

Durchführung:

Die Extraktion der Pigmente kann mit Hilfe verschiedener Lösungsmittel vorgenommen werden:

1) Extraktion mit Aceton:
Etwa 10 g Blattmaterial werden grob zerkleinert und in einer Reibschale nach Zugabe von etwas Seesand, sowie einer Spatelspitze $CaCO_3$, welches die aus den Vakuolen austretenden organischen Säuren neutralisiert und so die Pheophytinbildung verhindert, mit 60 mL Aceton versetzt und für 5-10 Minuten zerrieben, bis eine breiartige Masse entstanden ist. Diese wird durch einen Faltenfilter in ein mit Alufolie umhülltes Becherglas filtriert. Je länger und intensiver der Blattaufschluss durchgerührt wird, desto größer ist die Ausbeute an ß-Carotin. Da der acetonische Rohchlorophyllextrakt nur wenige Tage relativ unverändert im Kühlschrank aufbewahrt werden kann, sollte er entweder möglichst rasch verwendet oder durch Überführung in ein wasserfreies Medium (z.B. Petroleumbenzin) haltbarer gemacht werden. Hierzu wird das Filtrat mit etwa 25 mL Petroleumbenzin in einen Scheidetrichter gegeben und gründlich durchmischt, aber nicht

geschüttelt. Anschließend fügt man 50-100 mL halbgesättigte NaCl-Lösung hinzu und schwenkt vorsichtig um. Dabei lösen sich die lipophilen Chloroplastenpigmente in der oberen Petroleumbenzinphase, die sich tiefgrün färbt, während die untere wässrige Phase fast farblos erscheint. Sie wird abgelassen und verworfen. Die zurückbleibende Benzinphase wird weitere 2-3 mal mit jeweils 10 mL Wasser versetzt, wobei sich noch vorhandene Reste von Aceton in der wässrigen Phase lösen und so entfernt werden. Um den Petroleumbenzinextrakt schließlich völlig wasserfrei zu machen, gibt man eine Spatelspitze wasserfreies Na_2S0_4 hinzu, welches die letzten Wasserreste bindet.

Der Extrakt wird dann in einem Messkolben aufgefangen und kann im Dunkeln im Kühlschrank einige Wochen aufbewahrt werden.

2) Extraktion mit Ethanol:
Ca. 10 g grob zerkleinertes Blattmaterial werden in einerReibschale mit etwas Seesand und einer Spatelspitze $CaC0_3$ versetzt, nach Zugabe einer kleinen Menge 96 %igen Ethanols kräftig zerrieben und der entstehende Extrakt in ein Becherglas filtriert, das mit Alufolie umwickelt ist. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis der in der Reibschale zurückbleibende Blattbrei nahezu farblos ist. Die filtrierte Lösung kann im Dunkeln im Kühlschrank für einige Tage ohne wesentliche Veränderungen aufbewahrt werden.

Die Extraktion der Pigmente lässt sich durch ein kurzes Aufbrühen der Blätter bzw. die Verwendung von heißem Alkohol beschleunigen.

3) Extraktion mit Methanol:
Etwa 10 g zerschnittenes oder per Hand grob zerkleinertes Blattmaterial werden zusammen mit einer Spatelspitze CaC03 in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit 80 mL Methanol versetzt und im Wasserbad bei 50 °C (da der Siedepunkt von Methanol bei 65 °C liegt, sollte diese Temperatur nicht wesentlich überschritten werden) so lange extrahiert, bis das Methanol tiefgrün gefärbt ist. Der Vorgang kann durch Umrühren mit einem Glasstab beschleunigt werden. Anschließend wird der so entstandene Extrakt in ein mit Alufolie umhülltes Becherglas filtriert. Im Kühlschrank ist der methanolische Rohchlorophyllextrakt für einige Tage ohne wesentliche Veränderungen haltbar.

Bemerkung:

Methanol ist giftig beim Einatmen und Verschlucken, Aceton ist leicht flüchtig,deshalb sollten die entsprechenden Extraktionen - wenn möglich - unter einem Abzug durchgeführt werden. Da organische Lösungsmittel außerdem leicht entflammbar sind, sollte nicht in der Nähe von Zündquellen und offenen Flammen gearbeitetwerden (elektrisch beheizbares Wasserbad!) und die Vorratsflaschen sofort nach Entnahme der Substanzen verschlossen werden.

Versuch d) Dünnschichtchromatographische Trennung der Chloroplastenfarbstoffe

Kurz und knapp:

Mit der Dünnschichtchromatographie (DC) wird in diesem Versuch ein weiteres Verfahren zur Zerlegung eines Pigmentextraktes in die einzelnen Komponenten vorgestellt. Dabei werden nur sehr geringe Substanzmengen benötigt, und durch die verhältnismäßig geringe Ausbreitung der Flecken bzw. Banden bei gleichzeitig großer Trennschärfe wird eine sehr deutliche Trennung der Chloroplastenfarbstoffe erreicht.

Zeitaufwand:

Vorbereitung: 15 min zur Herstellung eines acetonischen Rohchlorophyllextraktes (falls noch nicht vorhanden). Werden keine DC-Fertigplatten verwendet, müssen 40-60 min für die Beschichtung der Platten eingeplant werden. Durchführung: ca. 40 min

Material: acetonischer Rohchlorophyllextrakt

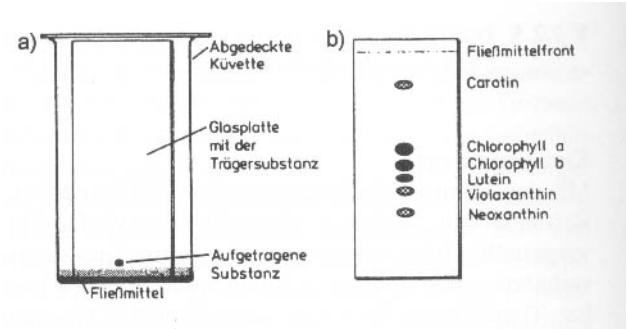
Geräte: Trennkammer oder großer Standzylinder mit dicht schließendem Deckel, DC-Fertigplatten (Kieselgel F_{254}, Fa. Merck; 5 x 20 oder 20 x 20 cm), Glaskapillaren, Filtrierpapier, Becherglas (200 mL), bei eigenhändiger Beschichtung der Platten: Glasplatten passender Größe, Streichgerät, Arbeitsschablone (gegen Verrutschen), Küchenmixer

Chemikalien: DC-Laufmittel: Petroleumbenzin (Siedeb. 100-140 °C), Isopropanol, Aqua dest. im Volumenverhältnis 100 : 10 : 0,25 gemischt (Achtung: Aqua dest. zuerst in Isopropanol geben!), bei eigenhändiger Beschichtung der Platten: Kieselgel (silanisiert, z.B.Kieselgel H_{254}, Fa. Merck), Agua dest.

Durchführung:

Für die eigenhändige Beschichtung von 10 Platten (5 x 20 cm) werden 15 mg Kieselgel und 50 mL Aqua dest. in einem Küchenmixer auf höchster Stufe 1 Minute verrührt. Die Masse wird anschließend etwa 0,25 mm dick mit dem Streichgerät ausgestrichen und luftgetrocknet.

Mit einer 5 µL- oder 10 mL-Glaskapillare werden in einer Höhe von ca. 2,5 cm über dem Plattenrand 10, 20 und 30 µL Pigmentextrakt an zuvor markierten Punkten auf die DC-Platte aufgetragen. Die saubere und trockene Trennkammer wird mit Filtrierpapier ausgekleidet, das mit Laufmittel befeuchtet wird (dabei Spalt freilassen, um später die eingestellte Platte beobachten zu können). Anschließend füllt man die Trennkammer etwa 1 cm hoch mit dem in einem Becherglas angesetzten Laufmittel und verschließt sie sofort mit einem Deckel. Nach dem Trocknen der Flecken, wird die DC-Platte so in die mit Laufmittel gefüllte Kammer gestellt, dass die Auftragspunkte nicht benetzt werden (siehe nachfolgende Abbildung. Falls mehrere Platten in die gleiche Kammer kommen sollten sie gleichzeitig eingestellt werden. Nach dem Einstellen ist die Kammer sofort wieder zu verschließen. Die Versuchsanordnung sollte bis zum Abschluss der Entwicklung nicht mehr geöffnet und für 30 Minuten dunkel aufgestellt werden, biseine Laufhöhe von etwa 10 cm erreicht ist.



Beobachtung:

Nach etwa 30 Minuten hat sich der Pigmentextrakt in die einzelnen Komponente aufgetrennt. Diese sind als deutlich umgrenzte Flecken in unterschiedlicher Höhe auf der DC-Platte zu erkennen. Das ß-Carotin befindet sich in der Nähe der Laufmittelfront. Dahinter folgen in absteigender Reihenfolge Chlorophyll a, Chlorophyll b und die Xanthophylle Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin.

Erklärung:

Wie bei der Papierchromatographie erfolgt auch hier die Trennung der Pigmentdurch das in den Kapillarräumen der Trägersubstanz hochsteigende Laufmittel. Allerdings stellt die beschriebene Dünnschichtchromatographie mit Kieselgelplatten im Gegensatz zur Papierchromatographie in V 7.2.3 keine reine Adsorptionschromatographie dar. Es handelt sich vielmehr bestimmend um eine Verteilungschromatographie, bei der sich die Substanzen je nach ihrer Löslichkeit auf die polare, flüssig stationäre Phase (Isopropanol / Wasser) und die mehr oder weniger unpolare, lipophile mobile Phase (Petroleumbenzin) verteilen. Beide Phasen sind nur begrenzt miteinander mischbar. Stoffe, die in der polaren stationären Phase löslich sind, bwegen sich gar nicht oder nur sehr langsam, Stoffe, die in der unpolaren mobilen Phase löslich sind, bewegen sich schneller fort und wandern weiter. Zugrunde gelegt werden kann der NERNSTsche Verteilungssatz:

$$\alpha = \frac{C1}{C2} = \text{konstant}$$

(α = Verteilungskoeffizient; C1, C2 = Gleichgewichtskonzentration einer Substanz in der stationären bzw. der mobilen Phase)

Zwei Substanzen mit verschiedenen Verteilungskoeffizienten für ein zweiphasiges Lösungsmittelsystem reichem sich also unterschiedlich in einer Phase an. Diese Tatsache wird bekanntlich beim Ausschütteln von gelösten Substanzen ausgenützt. Wenn die a-Werte nicht stark verschieden sind, benötigt man unter Umständen viele aufeinanderfolgende Ausschüttelvorgänge, um zu reinen Fraktionen zu kommen. Bei der Verteilungschromatographie handelt es sich um eine kontinuierliche Folge vieler derartiger Austauschprozesse zwischen einer stationären Phase, welche an einer inerten, quellbaren Trägerschicht haftet, und einer mobilen Phase. Unter ständiger Neueinstellung der Gleichgewichte zwischen beiden Phasen kommt es dann zu einer Trennung der einzelnen Komponenten. Die Trägerschicht ist also hier am eigentlichen Trennprozess nicht beteiligt; sie dient lediglich dazu, die stationäre Phase aufzunehmen und der Diffusion entgegenzuwirken.

Bemerkung:

Um eine Ausreichung der Pigmente zu verhindern, sollte bei der Durchführung und der Auswertung der Dünnschichtchromatographie nicht in grellem Licht gearbeitet werden.

Versuch e) Fluoreszenz von Chlorophyll in Lösung

Kurz und knapp:

Der Versuch zeigt, dass ein elektronisch angeregtes Chlorophyllmolekül unter bestimmten Bedingungen die absorbierten Lichtquanten auch wieder in Form von längerwelliger, d.h. energieärmerer Strahlung abgeben und dadurch in den energieärmeren Ausgangszustand zurückkehren kann.

Zeitaufwand:

Vorbereitung: falls nicht bereits vorhanden 15 min zur Herstellung eines methanolischen Rohchlorophyllextraktes, Durchführung: 5-10 min

Material: methanolischer Rohchlorophyllextrakt
Geräte: 3 Reagenzgläser mit Ständer, Tropfpipette, UV-Lampe (langwelliges UV = UV-A: ca. 350 nm) und dunkler Hintergrund, verdunkelbarer Raum
Chemikalien: Methanol, Aquadest.

Durchführung:

Reagenzglas l wird einige Zentimeter hoch mit Methanol gefüllt und fungiert als Kontrolle. In die Reagenzgläser 2 und 3 gibt man unverdünnten bzw. mit Methanol verdünnten Rohchlorophyllextrakt. Die Füllhöhe der 3 Reagenzgläser sollte in etwa identisch sein. Dann werden alle 3 Ansätze im abgedunkelten Raum unter der UV-Lampe betrachtet und miteinander verglichen. Anschließend gibt man mit einer Tropfpipette schrittweise Aqua dest. in die Reagenzgläser 2 und 3 und beobachtet abermals unter der UV-Lampe und danach im normalen Licht.

Beobachtung:

Bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert das Methanol nicht, die Rohchlororophylllösungen zeigen dagegen eine deutliche Rotfluoreszenz, die verdünnte Lösung in Ansatz 3 jedoch stärker als die unverdünnte Lösung.

Setzt man den beiden fluoreszierenden Ansätzen dann tropfenweise Aqua dest. zu, so beobachtet man eine allmähliche Löschung der Fluoreszenz. Im normalen Licht erscheinen die Lösungen nun nicht mehr klar, sondern trübe.

Erklärung:

Durch die energiereiche UV-Strahlung werden die π-Elektronen der Chlorophyllmoleküle in höhere Anregungszustände (2. oder 3. Singulettzustand) versetzt.Diese sind allerdings sehr instabil und gehen innerhalb von etwa l 0^{-12} s in den l. Singulettzustand über, wobei die Energiedifferenz gänzlich als Wärme verloren geht. Erst beim Rückfall vom l. Singulett- in den Grundzustand kann die Energiefreigabe in Form von Strahlung erfolgen, die jedoch längerwelliger und damit energieärmer ist als die Anregungsstrahlung (Fluoreszenz; vgl. Abb. 7.5). Die beobachtete geringere Fluoreszenz der konzentrierten Chlorophylllösung beruht auf der Tatsache, dass hier das entstehende Fluoreszenzlicht durch eine starke Rückabsorption abgeschwächt bzw. durch Kollision der Chlorophyllmoleküle als Wärme abgegeben wird.

Die Löschung der Fluoreszenz (engl.: quenching) durch Zugabe von Aqua dest. rührt daher, dass das Chlorophyll aus einer echten Lösung in die kolloidale Verteilungsform übergeht. Die Chlorophyllmoleküle besitzen neben dem hydrophilen Porphyringerüst, einen hydrophoben Phytolschwanz. In wässriger Lösung ordnen sich die Moleküle deshalb in Form von Micellen zusammen, wobei die hydrophilen Anteile nach außen zum Wasser hin, die hydrophoben Anteile nach innen weisen. Durch die Bildung dieser Chlorophyllaggregate wird die Energieübertragung auf die Nachbarmoleküle und die Energiefreigabe in Form von Wärme begünstigt, die Fluoreszenz erlischt. Zudem führt diese Anordnung zu einer starken Lichtstreuung, weshalb die Lösungen im normalen Weißlicht trübe erscheinen.

Bemerkung:

Um Augenreizungen oder gar -Schädigungen zu vermeiden, darf nicht direkt in das UV-Licht geschaut werden! Sollte die Konzentration der Rohchlorophylllösung nicht hoch genug sein, so kommt es bei einer Verdünnung mit Methanol zu keiner nennenswerten Steigerung der Fluoreszenz.

Gruppe 7: Atmung und Photosynthese

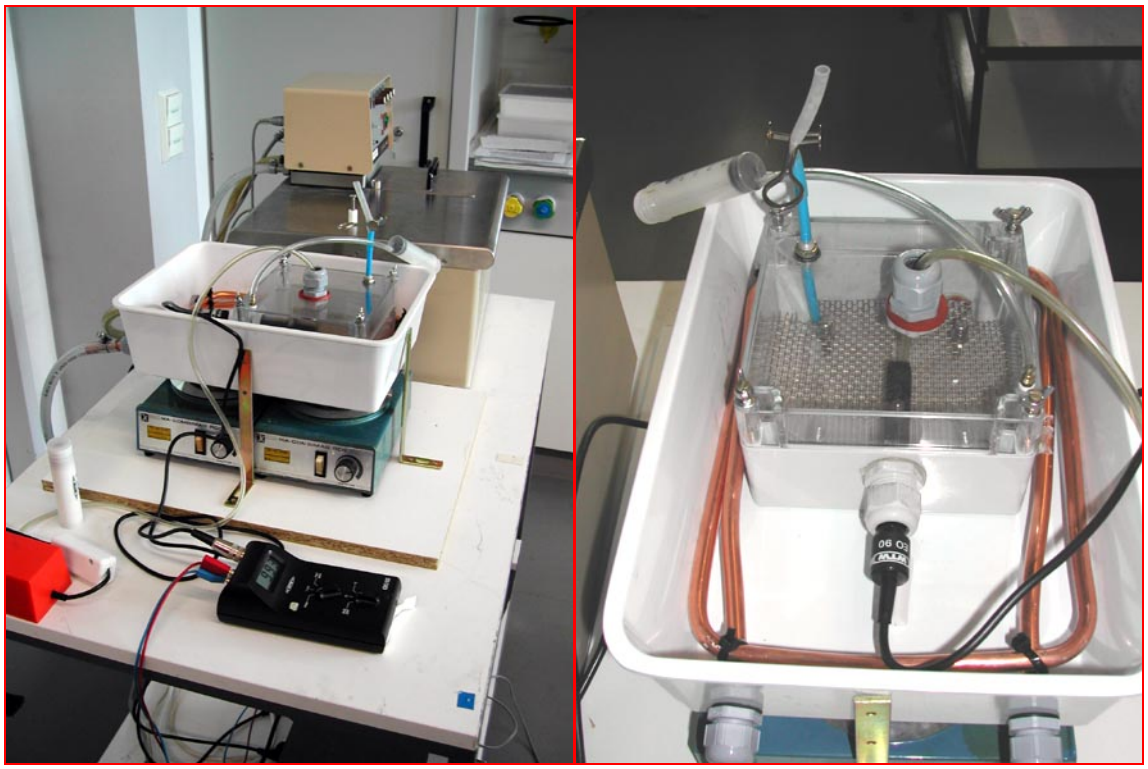
Versuch 7a) Elektrochemische Sauerstoffmessung : Abhängigkeit des Sauerstoffgehaltes von der Wassertemperatur

A) Material *Elodea canadiensis.*(Wasserpest) oder eine Algenkultur von *Euglena gracilis*
Hinweis: Beim Einsatz von Elodea kann der Versuch durch das Abschneiden etwa 6cm langer Sprosstücke beschleunigt werden

B) Geräte Sauerstoffelektrode, Umlaufthermostat, Kompensationsschreiber, Diaprojektor, Stickstoffzylinder mit Reduzierventil, Injektionsspritze mit feiner Kanüle, Rührstäbchen, Färb- und Graufilter..

C) Chemikalien Na-Dithionit

D) Versuchsaufbau im Institut für Pflanzenökologie



E) Kalibrierung:
Die Kalibrierung der Sauerstoffelektrode erfolgte anhand einer mit Luftsauerstoff gesättigten wässrigen Messlösung (**Achtung: Nicht die späteren Probenlösungen verwenden sondern einen separaten Ansatz !** Sauerstoffgehalt bei 100% O_2-Sättigung: 240µM bei 20°C bzw. 212µM bei 37°C). 100% Sauerstoffsättigung erreicht man mit einer Aquarium Pumpe in 20 –30 min. Durch Zugabe von Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) erfolgt eine 100%ige Reduktion des gelösten Sauerstoffes,

so dass der Nullpunkt des Messbereiches erreicht wird. Die Berechnung des absoluten Sauerstoffverbrauchs wird unter der Annahme der linearen Abhängigkeit des Elektrodenpotentials von der Sauerstoffkonzentration durchgeführt.

F) Versuchsdurchführung:
Probe 1 (Geräteuntergrund): Zunächst wird die Apparatur zusammengebaut und nur mit Nährlösung (ohne Pflanzenmaterial) gefüllt., der Umlaufthermostat auf 25°C eingestellt, der Magnetrührer eingeschaltet und der Abschlussstopfen so weit eingedreht, dass der Messraum luftblasenfrei gefüllt ist. Zuvor wird die Elektrode an einen Kompensationsschreiber angeschlossen. Die Änderung der Sauerstoffentwicklung wird über einen Zeitraum von ~20 Minuten gemessen.
Korrekturprobe (Photosynthese/Atmung): Der Reaktionsraum wird mit der vorher gewogenen *Elodea*-Kultur gefüllt und mehrere min mit Stickstoff [N, oder Kohlendioxid (CO_2)] durchgast. Sobald die O_2-Konzentration auf ~1/3 des Ausgangswertes abgesunken ist, wird die Begasung abgebrochen, Der Ausgangswert wird auf dem Schreiberstreifen markiert; dann wird für ~20 Minuten die Beleuchtung (Diaprojektor) eingeschaltet. Nach Abschalten des Lichtes wird über den gleichen Zeitraum der bei Einsatz von intakten Zellen durch die Atmung bedingte - O_2-Verbrauch gemessen; dieser Wert dient später zur Korrektur der Messdaten.
Probe 2 (Atmung): Der Reaktionsraum wird abgedunkelt (mit Aluminiumfolie) und mit N_2 oder CO_2 belüftet bis die O_2-Konzentration auf ~1/3 des Ausgangswertes abgesunken ist (alternativ kann 1%ige Natriumthionitlösung und Natriumhydrogencarbonat hinzugegeben werden).. Die Änderung der Sauerstoffentwicklung wird über einen Zeitraum von ~20 Minuten gemessen.
Probe 3 (Substratmangel): Der Reaktionsraum wird mit 10 Minuten mit N_2 belüftet. Im Anschluss wird die Aluminiumfolie entfernt und die Beleuchtung eingeschaltet. Die Änderung der Sauerstoffentwicklung wird über einen Zeitraum von ~20 Minuten gemessen.
Probe 4: Der Reaktionsraum wird mit CO_2 (gegebenenfalls auch mit Sauerstoff) belüftet bis die O_2-Konzentration den gleichen Wert erreicht wie bei Probe 2. Die Änderung der Sauerstoffentwicklung wird über einen Zeitraum von 20 Minuten gemessen.
Probe 5 und 6: Wie Probe 4 mit der Ausnahme, das der Umlaufthermostat eine Temperatur von 35°C bzw. 8°C eingeregelt hat.

Probenansatz	*Elodea*	Licht	CO_2	Temperatur
1	—	+	+	25 °C
2	+	—	+	25 °C
3	+	+	—	25 °C
4	+	+	+	25 °C
5	+	+	+	35 °C
6	+	+	+	8°C

Beobachtung:
Probe l: Auch nach 20 Minuten Belichtung ist die Sauerstoffentwicklung sehr gering.
Probe 2: Auch nach 20 Minuten Belichtung ist die Sauerstoffentwicklung sehr gering.
Probe 3: Auch nach 20 Minuten Belichtung ist die Sauerstoffentwicklung sehr gering.
Probe 4: Nach ca. 5-6 Minuten ist eine Sauerstoffentwicklung sichtbar; nach 15 Minuten ist ein lineare Sauerstoffzunahme erkennbar.
Probe 5: Ähnlich Probe 4 aber deutlich stärkere Sauerstoffentwicklung
Probe 6: Erst nach etwa 12 Minuten tritt eine sichtbare Sauerstoffentwicklung auf; nach mehr als 20 Minuten ist eine lineare aber sichtbar geringere Sauerstoffentwicklung als in den Proben 4 und 5 erkennbar.

Erklärung:
Die oben beschriebenen Beobachtungen zeigen, dass die Pflanze nicht photosynthetisch aktiv sind, wenn ihr Licht oder CO_2 fehlen (vgl. Proben 2 und 3). Weiterhin lassen die Versuchsergebnisse

Rückschlüsse auf den Einfluss der Temperatur auf die Photosyntheseintensität zu. Diese ist bei tiefen Temperaturen deutlich geringer als bei Raumtemperatur und scheint ihr Temperaturoptimum sogar noch oberhalb der Raumtemperatur zu haben (vgl. Proben 4 bis 6: zunehmende Steigung bzw. Sauerstoffentwicklung mit steigender Temperatur).

G) Auswertung: Vom jeweiligen Anstieg der Messwerte (mV) soll auf die O_2-Konzentration der Suspension geschlossen werden. Die Daten sind auf µmol O_2/g FG * h umzurechnen (Siehe Tabellen am Ende des Versuchs 7..

Versuch 7b) Atmung einer Algenkultur von Euglena gracilis

Ein kleiner Erlenmeyerkolben (50 ml) wird mit der Algenkultur gefüllt und die Elektrode mit einem Stopfen luftblasenfrei eingesetzt. Außerdem wird ein Magnetrührstäbchen in den Erlenmeyerkolben gegeben und der Kolben auf einen Magnetrührer bei mittleren Drehzahlen gestellt. Der Kolben wird abgedunkelt (schwarzes Tuch oder Alufolie), und nach kurzer Adaptationszeit wird der Sauerstoffverbrauch bestimmt. Wenn den Abfall der Sauerstoffkonzentration gleichmäßig ist, messen wir die Konzentration jede Minute über einen Zeitraum von 5 min und notieren die Werte. Daraus berechnen wir den Verbrauch nach folgendem Verfahren:
Man ermittelt die Differenz der digitalen Einheiten (oder die Spannung bei dem batteriebetriebenen Gerät oder des Schreiberausschlags) des 100 % O_2-gesättigten Mediums und des Mediums, das 0 % O_2 enthält (s. oben) und teilt durch das Volumen im Messgefäß (in ml).

Beispiel: 200 digitale Einheiten (DU) bei 0 % O_2, 2200 digitale Einheiten bei 100 % O_2 = 2000 *digitale Einheiten Bei 50 ml Volumen entsprechen 40 DU = 9 µg/ml O_2 (bei 20° C). Eine DU entspricht damit 0,225 µg/ml. Außerdem berechnen wir die Zahl der Zellen pro ml. Nehmen wir 1 Million Zellen/ml an. Jetzt entnehmen wir den Anstieg (oder Abfall) der Sauerstoffkonzentration aus der Messdatei DATEI.O2 (bzw. dem Schreiberausdruck) während einer Minute. Wenn wir einen Anstieg von l DU pro min gefunden haben, entspricht das einer Sauerstoffproduktion von 0,225 µg/* 1000000 *Zellen = 0,225 pg/ Zelle pro min. Die Sauerstoffproduktion wird auf der Y-Achse aufgetragen. Die X-Achse stellt die Zeit oder bei den folgenden Photosynthesemessungen die Bestrahlungsstärke [W/m^2] dar.*

Zeitaufwand: 30 min für das Experiment und 30 min für die Auswertung

Versuch 7c) Bestrahlungsstärke-Reaktionskurve der Photosynthese

Wir bereiten ein Experiment wie im letzten Abschnitt vor. Statt der Dunkelabdeckung wird die Kultur jetzt mit einem Diaprojektor bestrahlt. Die Lichtintensität eines 250 W Diaprojektors (mit einer Optik mit 150 mm Brennweite) beträgt etwa 400 W m"^{2}, in einem Abstand von 50 cm gemessen. Sobald die Sauerstoffkonzentration gleichmäßig ansteigt, bestimmen wir den Anstieg jeweils 5 min lang. Dann reduzieren wir die Bestrahlungsstärke durch Einschieben von einer oder mehreren Neutralfilterfolien und wiederholen die Messung. Die beiliegenden Graufiltern lassen jeweils 10 % der Strahlung durch. Also, zwei Filter in Reihe geschaltet lassen l % der ursprünglichen Strahlung durch und drei Filter 0,1 %. Aus den Steigungen berechnen wir die Sauerstoffproduktion pro Zelle und Minute wie oben beschrieben und tragen die Werte gegen die Bestrahlungsstärke auf. Dabei entsteht eine Bestrahlungsstärke-Effektkurve. Die Berechnung der Sauerstoffproduktion pro Zelle und Zeiteinheit erfolgt nach dem oben beschriebenen Beispiel. Typischerweise zeigen Pflanzen bei niedrigen Bestrahlungsstärken eine Sauerstoffaufnahme (Atmung); erst oberhalb des sogenannten Kompensationspunktes steigt die Sauerstoffproduktion an und geht bei höheren Bestrahlungsstärken in die Sättigung über (siehe Abbildung).

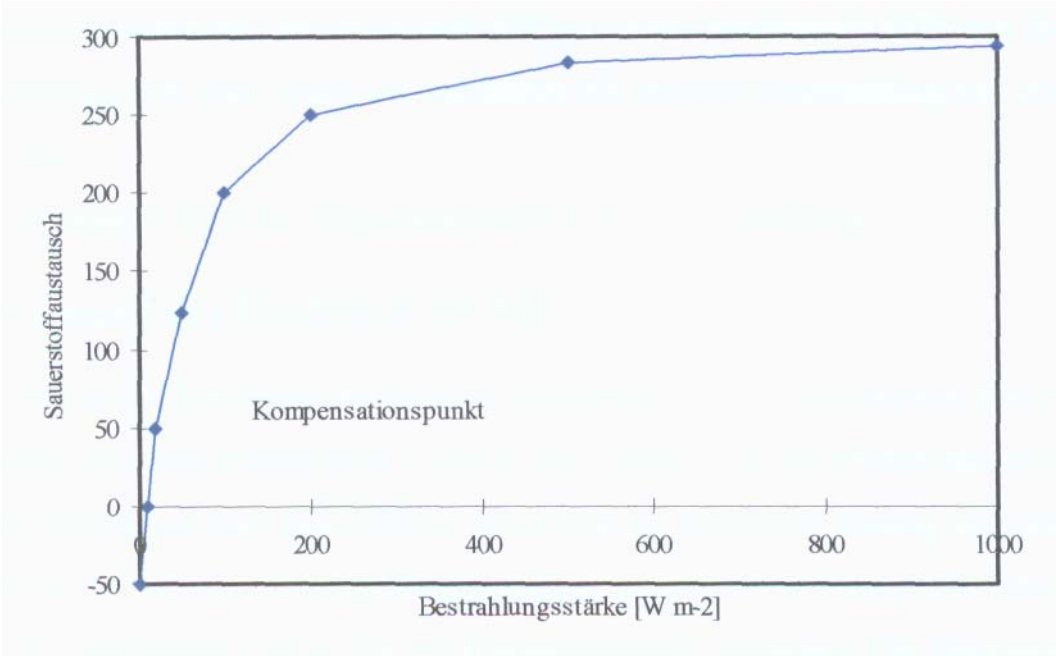


Abb. : Typische Bestrahlungsstärke-Reaktionskurve mit negativen Werten unterhalb des Kompensationspunktes und Sättigung

Die Zelldichte sollte keine höhere Absorption als 2 O.D. haben. Bei einer zu niederen Konzentration an Algen in der Messkammer ist die Sauerstoffproduktion zu gering, um von der Elektrode verarbeitet zu werden. Bei einer zu hohen Konzentration der Algen ist die Selbstbeschattung zu stark, d.h. es sind zu viele Algenschichten übereinander und die unteren Schichten sehen kein Licht mehr, so dass sie keine Photosynthese betreiben, sondern Respiration, welche die Photosynthese der übrigen Algen kompensiert oder sogar übersteigt. Ein weiterer Nachteil bei einer zu hohen Algenkonzentration in der Messkammer ist, dass das vorhandene CO_2 im Medium zu schnell verbraucht wird und die Algen keine Photosynthese mehr betreiben können. Außerdem wird das Medium, in dem sich die Algen befinden, schneller mit Sauerstoff gesättigt.

Zeitaufwand: l h für das Experiment und l h für die Auswertung

Temperatur °C	Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser im Gleichgewicht mit Luft bei einem Druck von 101,325kPa [$\rho(0)_s$) mg/l	Korrekturfaktor, der für den Salzgehalt, ausgedrückt in g/kg Gesamtsalzgehalt, abgezogen werden muss [$\triangle\rho(0)_s$] mg/l
0	14,62	0,0875
1	14,22	0,0843
2	13,83	0,0818
3	13,46	0,0789
4	13,11	0,0760
5	12,77	0,0739
6	12,45	0,0714
7	12,14	0,0693
8	11,84	0,0671
9	11,56	0,0650
10	11,29	0,0632
11	11,03	0,0614
12	10,78	0,0593
13	10,54	0,0582
14	10,31	0,0561
15	10,08	0,0545
16	9,87	0,0532
17	9,66	0,0514
18	9,47	0,0500
19	9,28	0,0489
20	9,09	0,0475
21	8,91	0,0464
22	8,74	0,0453
23	8,58	0,0443
24	8,42	0,0432
25	8,26	0,0421
26	8,11	0,0407
27	7,97	0,0400
28	7,83	0,0389
29	7,69	0,0382
30	7,56	0,0371

Tab.1: Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser als Funktion der Temperatur und des Salzgehaltes (nach ISO 5814)

Temperatur °C	Luftdruck [kPa(atm)[1])]						
	111,5 (1,1)	101,3 (1,0)	91,2 (0,9)	81,1 (0,8)	70,9 (0,7)	60,8 (0,6)	50,7 (0,5)
	Löslichkeit, $p'(0)_s$ (mg/l)						
0,0	16,09	14,62	13,14	11,69	10,21	8,74	7,27
5,0	4,06	12,77	11,48	10,20	8,91	7,62	6,34
10,0	12,43	11,29	10,15	9,00	7,86	6,71	5,58
15,0	11,10	10,08	9,05	8,03	7,01	5,98	4,96
20,0	10,02	9,09	8,14	7,23	6,30	5,37	4,44
25,0	9,12	8,26	7,40	6,56	5,70	4,84	4,00
30,0	8,35	7,56	6,76	5,99	5,19	4,60	3,62
35,0	7,69	6,95	6,22	5,47	4,75	4,01	3,28
40,0	7,10	6,41	5,72	5,03	4,34	4,65	2,96

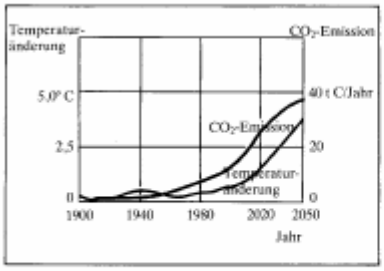
[1]) Einheiten für den barometrischen Normdruck (normaler Luftdruck auf Meereshöhe) 1 01 ,325 kPa = 1 01 ,325 kN/m2 = 1 atm - 760 mm HG

Tab. 2: Löslichkeit, $p'(O)_S$ von Sauerstoff in Wasser als Funktion der Temperatur und des Luftdrucks

Literatur

Nultsch, W.: Allgemeine Botanik. Thieme Verlag, 12. Aufl., 1996.
Richter, G.: Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, Thieme Verlag
Schopfer,P: Experimentelle Pflanzenphysiologie, Springer Verlag, 1989
Hall, D.O. and Rao, K. K.: Photosynthesis.Cambridge Univ. Press., 1994.
Lawlor, D. W.: Photosynthese. Thieme Verlag, Stuttgart, 1990.
Lichtenthaler, H., Pfister, K.: Praktikum der Photosynthese. Biologische Arbeitsbücher 21. Quelle & Meyer, Heidelberg, 1978.
Steinecke, F., Auge R.: Experimentelle Biologie. Biologische Arbeitsbücher 3, 5. Aufl. Quelle & Meyer, Heidelberg, 1983.
Strasburger, Lehrbuch der Botanik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991.
Tevini, M. und Hader, D.-P.: Allgemeine Photobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 1985.

Zusatzabbildungen:



Die Skizze zeigt das Resultat einer Modellrechnung des Zusammenhangs zwischen der wachsenden CO_2-Konzentration und der Temperaturzunahme auf der Erdoberfläche.

Abbildung 4-3:
Eine Modellrechnung des International Institute for Applied Systems Analysis, das eine Temperaturerhöhung um 4 °C in den kommenden 50 Jahre als möglich erachtet.

(Quelle: LANIUS, S. 273)

Tabelle 4-1: Charakteristika diverser Treibhausgase

Gas	Verweildauer in der Atmosphäre	Volumen-Mischungsverhältnis 1992 (in der Nordhemisphäre)	Zuwachsrate der 80er Jahre in % pro Jahr	GWP pro Molekül relativ zu CO_2
CO_2	> 100 Jahre	357 ppmv = 0,0357 %	0,4 - 0,5	1
CO	wenige Monate	0,15 ppmv = 0,000015 %	≈ 1	2
CH_4	≈ 10 Jahre	1,75 ppmv = 0,000175 %	0,8	25 - 30
H_2O	Tage bis Monate	0,0002 - 3,5 %		< 200
N_2O	≈ 150 Jahre	0,31 ppm = 0,000031 %	0,25	200
O_3	Tage bis Monate	0,01 - 10 ppmv		< 2.000
FCKW	60 - 300 Jahre	1 ppbv = 0,0000001 %	≈ 4	< 17.000

(Quelle: verändert nach Wissenschaftlicher Beirat der Bundesregierung, in: Bundesministerin für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, S. 62, Tab. 6.1)